



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Biotechnologické metody u rodu *Angelica*
a *Foeniculum***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autorka:	Barbora Haroková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Barbora Haroková
Název práce	Biotechnologické metody u rodu <i>Angelica</i> a <i>Foeniculum</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra botaniky, Oddělení tkáňových kultur a rostlinných biotechnologií
Vedoucí práce	RNDr. Božena Navrátilová, Ph. D
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá biotechnologickými metodami, zejména mikropropagací u dvou druhů z čeledi *Apiaceae* (miříkovité), konkrétně u *Foeniculum vulgare* (fenykl obecný) a *Angelica archangelica* (andělíka lékařská). Teoretická část patří literární rešerši na téma čeleď *Apiaceae*, rody *Angelica* a *Foeniculum*, biotechnologické metody, zejména explantátové kultury a mikropropagace. V experimentální části byl testován vliv sterilizačních roztoků 5% chloraminu T, 70% ethanolu a 36% roztoku sava na výskyt kontaminací. U semen *Angelica archangelica* bylo provedeno oživení pomocí roztoku GA₃. Semena byla vysazena na médium OK (MS; IBA 0,01 mg/l; BAP 0,01 mg/l; kys. askorbová 20 mg/l) nebo na filtrační papír. K multiplikaci bylo použito médium 1F (MS; IBA 0,1 mg/l; BAP 1 mg/l; kys. askorbová 20 mg/l). K zakořenění *in vitro* byly testovány média IAA (MS; IAA 0,1 mg/l) a IBA (MS; IBA 0,1 mg/l). Pro převod rostlin do nesterilních podmínek byl použit perlit nebo rašelinové tablety, tzv. jiffy. Byla úspěšně odvozena sterilní *in vitro* kultura u *Foeniculum vulgare*, ale u *Angelica archangelica* se *in vitro* kulturu odvodit nepodařilo. Oživení pomocí GA₃ nemělo na klíčivost semen *Angelica archangelica* vliv. Byl zjištěn pozitivní vliv 0,1% PPM v kultivačním médiu na snížení vnitřních kontaminací. Pro indukci zakořeňování se jevílo médium IBA (MS; IBA 0,1 mg/l) jako vhodnější než médium IAA (MS; IAA 0,1 mg/l).

Klíčová slova	<i>Angelica</i> , <i>Foeniculum</i> , mikropropagace, <i>in vitro</i> , explantátové kultury, <i>Apiaceae</i>
Počet stran	56
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Barbora Haroková
Title of thesis	Biotechnological methods by <i>Angelica</i> genera and <i>Foeniculum</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of botany, Section of tissue cultures and plant biotechnologies
Supervisor	RNDr. Božena Navrátilová, Ph. D
The year of presentation	2016

Abstract

The present thesis deals with biotechnological methods, especially micropropagation, in two species of *Apiaceae* family, specifically *Foeniculum vulgare* (fennel) and *Angelica archangelica* (angelica). The theoretical part includes a literature review on the topic of family *Apiaceae*, genera *Angelica* and *Foeniculum*, biotechnological methods, especially tissue culture and micropropagation. In the experimental part was tested the effect of sterilizing solutions 5% chloramine T, 70% ethanol and 36% solution of savon to the occurrence of contamination. For seeds of *Angelica archangelica* was performed enlivening by solution of GA₃. The seeds were planted on medium OK (MS; IBA 0,01 mg/l; BAP 0,01 mg/l; ascorbic acid 20 mg/l) or on a filter paper. The medium 1F (MS; IBA 0,1 mg/l; BAP 1 mg/l; ascorbic acid 20 mg/l) was used in multiplication. For rooting *in vitro* were tested media IAA (MS; IAA 0,1 mg/l) and IBA (MS; IBA 0,1 mg/l). For transfer plants in non-sterile conditions was used perlite or peat tablet called jiffy. It was successfully derived sterile *in vitro* culture in *Foeniculum vulgare*, but at the *Angelica archangelica in vitro* culture failed to derive. Enlivening by solution of GA₃ had no effect on germination of seeds of *Angelica archangelica*. It was found positive effect of 0,1 % PPM in culture medium to reduce internal contamination. For induction of rooting, IBA medium (MS; IBA 0,1 mg/l) was appeared to be more suitable than medium IAA (MS; IAA 0,1 mg/l).

Keywords	<i>Angelica</i> , <i>Foeniculum</i> , micropropagation, <i>in vitro</i> , tissue culture, <i>Apiaceae</i>
Number of pages	56
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Boženy Navrátilové, Ph.D s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala především RNDr. Boženě Navrátilové, Ph. D, za její odborné vedení, cenné rady a čas, který mi při řešení práce věnovala. Velké díky patří také všem, kteří mne při mém studiu podporovali, zejména mojí rodině.

OBSAH	
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Čeleď <i>Apiaceae</i>	10
2.2 Rod <i>Angelica</i>	11
2.2.1 <i>Angelica archangelica</i> L. (andělíka lékařská)	11
2.3 Rod <i>Foeniculum</i>	13
2.3.1 <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (fenykl obecný)	14
2.4 Biotechnologické metody	15
2.4.1 Explantátové kultury	17
2.4.1.1 Historie explantátových kultur	17
2.4.1.2 Využití a možnosti aplikace explantátových kultur	18
2.4.1.3 Techniky explantátových kultur	18
2.4.1.4 Mikropropagace	19
3 MATERIÁL A METODY	23
3.1 Rostlinný materiál	23
3.2 Pracovní postupy	24
3.2.1 Povrchová sterilizace semen	24
3.2.2 Oživování semen	25
3.2.3 Výsev semen	25
3.2.4 Izolace a kultivace embryí u <i>Angelica archangelica</i>	25
3.2.5 Kultivace rostlin	26
3.2.6 Pasážování	27
3.2.7 Převod do nesterilních podmínek	27
4 VÝSLEDKY	28
4.1 Povrchová sterilizace	28
4.1.1 Povrchová sterilizace semen u <i>Angelica archangelica</i>	28

4.1.2	Povrchová sterilizace semen u <i>Foeniculum vulgare</i>	29
4.2	Klíčivost	31
4.2.1	Klíčivost semen a embryí u <i>Angelica archangelica</i>	31
4.2.2	Klíčivost semen u <i>Foeniculum vulgare</i>	32
4.3	Multiplikace u <i>Foeniculum vulgare</i>	33
4.4	Zakořeňování <i>in vitro</i> u <i>Foeniculum vulgare</i>	34
4.5	Převod do nesterilních podmínek u <i>Foeniculum vulgare</i>	35
5	DISKUZE	40
5.1	Povrchová sterilizace	40
5.2	Klíčivost	41
5.3	Multiplikace u <i>Foeniculum vulgare</i>	42
5.4	Zakořeňování u <i>Foeniculum vulgare</i>	43
5.5	Převod do nesterilních podmínek u <i>Foeniculum vulgare</i>	44
6	ZÁVĚR	45
7	POUŽITÁ LITERATURA	46
8	PŘÍLOHY	51

SEZNAM ZKRATEK

2iP	isopentenyladenin
BAP	6-benzylaminopurin (6-benzyladenin)
GA ₃	kyselina giberelová
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry / plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
GC-FID	gas chromatography-flame ionization detection / plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
HSME-GC-MS	headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry / „headspace“ mikroextrakce rozpouštědlem, plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
HPLC-RI	high-performance liquid chromatography-refractive index / vysokoúčinná kapalinová chromatografie-index lomu
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
MS	médium MS (Murashige a Skoog, 1962)
NAA	kyselina naftalenoctová
PPM	Plant Preservative Mixture

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Studované rostliny *Angelica archangelica* (andělíka lékařská) a *Foeniculum vulgare* (fenykl obecný) patřící do čeledi *Apiaceae* (miříkovité) byly už od pradávna využívány v lidovém léčitelství (Kresánek a Kresánek, 2008). Nachází také široké uplatnění i v jiných odvětvích, než v lékařském. Semena *Angelica archangelica* se používají v cukrářství, při přípravě likérů nebo v parfumerii (Bhat a kol., 2011). U silice ze semen *Foeniculum vulgare* byl prokázán například larvicidní účinek (Zoubiri a kol., 2014).

Rostlinné explantáty, zejména techniky, které jsou orientovány na mikropropagaci (multiplikaci) nacházejí stále širší využití nejen v zahradnické praxi, ale současně i ve výzkumu. Dávají jedinečnou příležitost sledovat život rostlinné buňky a možnosti jejího dalšího růstu a vývoje (Hradilík, 2005). Mikropropagace představuje metodu, kdy lze za poměrně krátkou dobu získat velké množství rostlinných klonů. Rostliny jsou pěstovány na malých prostorech a mohou být množeny v průběhu celého roku (Bhatia a kol., 2015). Navíc geneticky transformované rostliny mohou v *in vitro* podmínkách produkovat vyšší hladiny sekundárních metabolitů (Giri a Narasu, 2000).

Byly vytyčeny následující cíle práce:

1. Shromažďování a studium literárních údajů k zadané problematice.
2. Odvození *in vitro* kultury u rodu *Angelica* a *Foeniculum*.
3. Optimalizování metody mikropropagace.
4. Průběžné zpracování získaných výsledků a fotodokumentace.
5. Sepsání bakalářské práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Čeleď *Apiaceae*

Čeleď *Apiaceae* (miříkovité) obsahuje až 270 rodů s 2850 druhy po celém světě (Jahodář, 2011). Zahrnuje velké množství rostlin, které jsou používány také v tradiční medicíně a mají léčivé vlastnosti (Christensen a Brandt, 2006). Charakteristická pro tuto čeleď je přítomnost sekundárních metabolitů. Rostliny produkují silice fenylypropanového i terpenového typu, také jsou syntetizovány polyiny, seskviterpenové laktony, ftalidy, triterpenové saponiny, kumariny či alkaloidy (Jahodář, 2011). Další látky jako polyacetyleny, zejména farcarinol a farcarindiol, se ukázaly jako vysoce toxické vůči houbám a bakteriím. U některých zástupců jsou známy i neurotoxické a protizánětlivé účinky (Christensen a Brandt, 2006).

Rostliny z čeledi *Apiaceae* se řadí mezi jednoleté až vytrvalé byliny. Lodyha je většinou dutá, rýhovaná. Listy jsou střídavé s čepelí obvykle členěnou nebo složenou a řapíky lodyžních listů mohou mít zřetelnou pochvu. Květy jsou v jednoduchém nebo složeném okolíku, pod květenstvím je vytvořený listenový obal a obalíček. Semeník je zakončen dvěma čnělkami na žláznatém valu (Jahodář, 2011). V oplodí poltivé žebernaté dvounažky (často s ostny a háčky) jsou cévní svazky a siličné schizogenní kanálky (Novák a Skalický, 2012).

Některé druhy miříkovitých patří mezi významné zeleniny, např. *Petroselinum crispum* (petržel kadeřavá), *Daucus carota* (mrkev obecná), jiné se používají v léčitelství a likérnictví – *Angelica archangelica* (andělíka lékařská) (Novák a Skalický, 2012). Čeleď také obsahuje jedovaté druhy, např. *Conium maculatum* (bolehlav plamatý), který obsahuje alkaloid koniin nebo *Cicuta virosa* (rozpuk jízlivý) - alkaloid cikutoxin.

Jsou zaznamenány i negativní účinky těchto rostlin (Novák a Nováková, 2010). Můžeme se setkat s kontaktními nebo potravinovými alergiemi. *Angelica archangelica* obsahuje silici bohatou na furanokumariny, které vyvolávají u citlivých osob dotykovou alergii a fotosenzibilitu – svědění až pálení pokožky, vyrážky a ekzémy. Podobné fytodermatózy může v kombinaci se slunečním zářením vyvolat i *Foeniculum vulgare* (fenykl obecný), *Pastinaca sativa* (pastinák setý), *Anethum graveolens* (kopr vonný) atd.

2.2 Rod *Angelica*

Zařazení rodu *Angelica* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
podříše:	<i>Cormobionta</i> (cévnaté rostliny)
oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
třída:	<i>Magnoliopsida</i> (dvouděložné rostliny)
podtřída:	<i>Cornidae</i>
řád:	<i>Araliales</i> (aralkotvaré)
čeleď:	<i>Apiaceae</i> (miříkovité)
rod:	<i>Angelica</i> (andělka)

Do rodu *Angelica* patří více než 60 druhů léčivých rostlin, některé z těchto druhů se používají v tradiční medicíně a to zejména na dálném východě (Sarker a Nahar, 2004).

Angelica sylvestris, známá jako „wild angelica“, je skotská léčivá rostlina, která roste obvykle na vlhkých loukách, bažinách a lesích (Clapham a kol., 1987). Je rozšířena téměř v celé Evropě, vzácněji na jihu, také v mírném pásmu Asie.

Angelica sinensis, někdy také „Dong quai“, čínská varieta (Kresánek a Kresánek, 2008). Používaná po tisíce let v čínském lidovém léčitelství, nejčastěji při revmatických bolestech a menstruačních problémech. Domácí je v Číně, Koreji a Japonsku.

Angelica glauca, místně „Vern Choru“ či „Gandhrayan“ je kriticky ohrožená, vytrvalá léčivá bylina rostoucí v himalájské oblasti (Mamgain a kol., 1998). Přesněji se vyskytuje od mírné až po alpínskou zónu Kašmíru, oblasti Himachal Pradesh a Uttaranchal, v nadmořské výšce 1800 – 3200 m.n.m. (Samant a kol., 1998).

Dalšími druhy jsou např. *Angelica atropurpurea*, *Angelica acutiloba*, *Angelica dahurica*, *Angelica edulis*, *Angelica gigas*, *Angelica koreana*, *Angelica keiskei* atd. Jejich tradiční použití je jako diuretikum, expektorans, protizánětlivý přípravek, proti nachlazení, chřipce, zažívacím potížím. Dále na gynekologické potíže, ekzémy, bakteriální nebo plísňové infekce (Sarker a Nahar, 2004; Kresánek a Kresánek, 2008). V České republice roste pouze *Angelica archangelica* a *Angelica sylvestris* (Kresánek a Kresánek, 2008).

2.2.1 *Angelica archangelica* L. (andělka lékařská)

V rámci této bakalářské práce jsme se zaměřili na *Angelica archangelica* (andělka lékařská). *Archangelica* pochází z řeckého slova arkhangelos (arch = anděl) (Bhat a kol.,

2011). Název je odvozen od archanděla Michaela. Na území České republiky se rozšířila v průběhu středověku, jako prostředek proti moru (Kresánek a Kresánek, 2008).

Dle některých botaniků je původní druh ze Sýrie a odtud byl posléze rozšířen do dalších zemí, kde se aklimatizoval. Příležitostně můžeme najít původní druh v chladných a vlhkých místech ve Skotsku, hojněji však v zemích dále na sever, například na Islandu (Bhat a kol., 2011). Divoce roste v Evropě a západní Asii u vodních toků, v horách u horských potoků a bystřin, v ČR jen ve vyšších polohách. V České republice byla vyšlechtěna odrůda Jizerka v roce 1952 (Neubauer a kol., 1984).

Anděllice se nejlépe daří na hlubokých, humusem zásobených, vlhčích půdách (Kresánek a Kresánek, 2008). Snáší i kyselější rašelinné půdy. Je velmi citlivá na déletrvající sucho, avšak nesnáší ani trvalejší zamokření půdy. Příliš těžké půdy nejsou vhodné, a to i s ohledem na sklizeň kořenů (Neubauer a kol., 1984).

Andělka je dvouletá až čtyřletá statná bylina s řepovitým oddenkem a s černými větvenými kořeny (Jahodář, 2011). V prvním roce vegetace vytváří bohatou růžici přizemních listů, v druhém roce vyhání přímou, dutou a rýhovanou květonosnou lodyhu, až 2 m vysokou. Listy má střídavé, dva až třikrát zpeřené, v celkovém obrysu trojúhelníkovité. Zelenobílé květy jsou ve složených okolících (až 20 cm v průměru). Plodem jsou elipsoidní dvounažky, každá nažka má tři žebra, nažloutlé barvy. Kvete v červenci a srpnu.

Sbírá se plod – *Angalicae fructus* a kořen *Angalicae radix*. Kořen se sklízí zpravidla v druhém roce pěstování, v září až říjnu. Sklizeň je možná i na jaře (březen, duben) vždy však předtím, než začne andělka rašit. Plod se sbírá před dozráním (září), s celými okolíky, nechá se doschnout, vymlátí se a dosuší (Kresánek a Kresánek, 2008). Sušení přirozeným teplem není příliš vhodné, je pomalé a kořeny mohou začít plesnivět. Dává se přednost sušení umělým teplem, teplota nesmí překročit 40 °C. Sesychací poměr plodů je malý, u kořene 4-5 : 1 (Neubauer a kol., 1984).

Rostlina mimo jiné obsahuje esenciální oleje, hořčiny, angelicin, silice, třísloviny, cukr a kyseliny (kyselina valerová a angeliková) (Bhat a kol., 2011). Hlavní část esenciálních olejů z kořene *Angelica archangelica* tvoří monoterpenické uhlovodíky. α -pinene byl nalezen jako dominantní složka ve více než polovině zkoumaných olejů získaných z Finska, Norska, Francie a Brazílie. Dále je obsažen δ -3-carene, β -phellandrene, β -pinene, limonene, *p*-cymene či α -phellandrene (Nivinskiene a kol., 2005). Bylo zjištěno, že relativní množství monoterpenických uhlovodíků se liší. Variabilita je závislá na řadě parametrů, jako je

například rozmanitost anděliky lékařské, metody extrakce či analytické postupy (Pasqua a kol., 2003). Výsledky studie, kterou provedl Pasqua a kol. (2001) ukazují, že syntéza a akumulace esenciálních olejů je úzce spojena s diferenciací sekundárních sekrečních kanálů. Chemické složení esenciálních olejů u anděliky lékařské bylo zkoumáno také v souvislosti s vývojovou fází kořene. Pasqua a kol. (2003) zjistili, že pouze hlavní kořeny o průměru větším než 5 mm dosahují plné kapacity biosyntézy olejů. V primárních kanálcích se esenciální oleje nehromadí.

Kořeny a plody jsou nejvíce využívány pro medicínské účely. Řadí se do farmakologické skupiny fytofarmaka – stomachika. Jejich účinnost je amaro-aromatická, zvyšují tvorbu žaludečních šťáv a sekreci pankreatu. Uplatňují se hojně jako složky žaludečních čajových směsí, na povzbuzení nervové činnosti (zevně jako přísada do relaxačních koupelí, mohou se použít i listy), při nadýmání, také jako kloktadlo při zánětech dutiny ústní, působí močopudně (Korbelář a Endris, 1990; Kresánek a Kresánek, 2008).

Všechny části anděliky mají příjemné, typické aróma, proto se používají i v potravinářství. Nejčastěji stonky a semena v cukrářství a při přípravě likérů. Stonek se ve velké míře používá také při přípravě konzervovaného ovoce a zavařenin. Chut' semen připomíná plody jalovce, často se proto andělíka používá v kombinaci s bobulemi jalovce či jako jejich náhrada v palírnách. Semena jsou používána také v parfumerii (Bhat a kol., 2011). Znamé je také použití kořene jako přísady do speciálních žaludečních likérů, např. Benediktýnka, Chartreuse, Boonekamp aj. (Kresánek a Kresánek, 2008).

2.3 Rod *Foeniculum*

Zařazení rodu *Foeniculum* do systému vyšších rostlin (Cronquist, 1988):

říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
podříše:	<i>Tracheobionta</i> (cévnaté rostliny)
oddělení:	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
třída:	<i>Magnoliopsida</i> (dvouděložné rostliny)
podtřída:	<i>Cornidae</i>
řád:	<i>Araliales</i> (aralkotvaré)
čeleď:	<i>Apiaceae</i> (miříkovité)
rod:	<i>Foeniculum</i> (fenykl)

2.3.1 *Foeniculum vulgare* Mill. (fenykl obecný)

Do druhu *Foeniculum vulgare* patří mnoho typů fenylku, které se liší vzhledem a výškou vegetativního systému, tvarem a velikostí plodů a složením esenciálních olejů. Tyto typy se dělí do dvou poddruhů: subsp. *piperitum* a subsp. *capillaceum* (Hunault a Manoir, 1992). V literatuře se můžeme setkat i s rozdělením na poddruhy *piperitum* a *vulgare* (Muckensturm a kol., 1997).

Do poddruhu *capillaceum* (někdy také *vulgare*) řadíme dvě odrůdy: *dulce* - „sladký fenylk“ a *vulgare* - „hořký fenylk“ (Torabi a kol., 2014). Odrůda *dulce* zahrnuje zpravidla letničky produkující sladké plody chutnající po anýzu. Odrůda *vulgare* tvoří trvalky, jejichž plody zanechávají hořkou pachut'. Tato odrůda je bohatší na silici a pěstuje se zejména pro výrobu anetholu (Hunault a Manoir, 1992).

Foeniculum vulgare Mill subsp. *vulgare* (fenylk obecný pravý), byl vyšlechtěn z *Foeniculum vulgare* subsp. *azoricum* pocházejícího z jihozápadní Evropy (Zelený, 2012). V České republice byla roku 1946 zapsána odrůda Moravský, varieta *dulce* (<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudach/odrudy-registrovane-v-cr/seznam-odrud>).

Plané rostliny fenylku obecného jsou běžně rozšířené ve Středozeří na úhorech, podél cest a na březích toků a náleží *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*, který se liší od *F. v.* subsp. *vulgare* sivozelenou barvou, kratšími úkrojky listů a menším počtem paprsků v okolíkách (Zelený, 2012).

Fenylku vyhovují slunečné a teplé místa (Kresánek a Kresánek, 2008). Půda by měla být výživná, hluboko zpracovaná, vlhká, vápenatá. Nesadí se v blízkosti kopru, protože dochází ke křížení při opylování a kopr má vliv na snížení úrody plodů.

Jedná se o dvouletou nebo vytrvalou bylinu s dužnatým kořenem (Korbelář a Endris, 1990). Dosahuje výšky až 2 metry. Lodyha je oblá, rýhovaná a větvená. Listy má v obrysu trojboké, pochvaté, 3-4krát zpeřené. Malé, sytě žluté květy jsou uspořádány ve složené okolíky. Plodem jsou pětižebné dvounažky. Fenylk kvete od července do září.

Sbírá se plod *Foeniculi fructus*, nejlépe ručně odřezáváním zralých okolíků v srpnu a září (Kresánek a Kresánek, 2008). Okolíky dozrávají postupně (tzv. „česaný fenylk“), poté se vymlátí a vyčistí. Suší se umělou teplotou (30 - 35 °C).

Rostlina obsahuje velké množství látek. Singh a kol. (2006) provedli analýzu těkavého oleje *Foeniculum vulgare* pomocí spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a dokázali přítomnost 35 různých složek. Hlavní komponentou byl

trans-anethol (70,1 %), dále pak fenchon (8,6 %), estragol (4,7 %), *p*-cymen a limonen (obojí 3,1 %), linalool (1,2 %). Ostatní složky jako např. β -pinen, α -pinen, terpinen-4-ol, *cis*-anethol, *p*-anisaldehyd se vyskytovali v množství menším než 1 %.

Telci a kol. (2009) zkoumali vliv stádia zrání plodů na obsah esenciálních olejů. Analýzu provedli také pomocí GC-MS. Uvádí, že obsah hlavní složky *trans*-anetholu se pohybuje mezi 81,63 % a 87,85 % a rozdíl je statisticky nevýznamný v průběhu zrání. Na druhou stranu množství některých komponentů, zvláště monoterpenů - α -pinen, β -myrcen, limonen a α -terpinen, se podstatně liší v průběhu zrání.

Plod *Foeniculum vulgare* je sekretomotorické, sekretolytické a antiseptické expektorans, spasmolytikum a farmakologicky patří mezi fytofarmaka skupiny karminativ (Kresánek a Kresánek, 2008). Používá se k posílení žaludeční a střevní činnosti, jako prostředek proti nadýmání. V lidovém léčitelství se používá ke zvýšení sekrece mléka. Také je to znamenité chuťové korigens. Obsažený anethol silně působí na zevní i vnitřní parazity u lidí i zvířat. Časem se polymerizuje na dianethol, který má účinky estrogení (Korbelář a Endris, 1990). Silice *Foeniculi etheroleum* se získává z plodů destilací vodní parou. Má podobné účinky jako plod (Kresánek a Kresánek, 2008).

Fenykl nachází využití i v jiných odvětvích než lékařském. *Oleum foeniculi* se používá v likérnickém průmyslu. Zbytky po oddestilování silice se užívají jako přípravek do krmiv pro dobytek, jelikož obsahují hodně bílkovin a slizu (Korbelář a Endris, 1990). Bylo zjištěno, že silice ze semen *Foeniculum vulgare* má larvicidní účinek proti komáru *Culex pipiens* (komár pisklavý), (Zoubiri a kol., 2014). Výsledky studie, kterou provedl Choi a Hwang (2004) ukázaly významnou protizánětlivou a analgetickou aktivitu a inhibiční účinky alergických reakcí při použití methanolového extraktu *Foeniculum vulgare*, pokud je podáván v dávce 200 mg/kg u myši a potkanů.

2.4 Biotechnologické metody

Rostliny z čeledi *Apiaceae* jsou dobře známé díky svým rostlinným produktům. Není tedy divu, že jsou předmětem zájmu mnoha výzkumů, které se zaměřují zejména na biosyntézu sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách.

Fang a kol. (2006) charakterizovali 76 těkavých složek v esenciálním oleji z *Foeniculum vulgare* pomocí spojení tří technik: HSME-GC-MS („headspace“ mikroextrakce rozpouštědlem, plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie). Analýzu pomocí GC-MS provedli také Singh a kol. (2006) a Telci a kol. (2009). Barros

a kol. (2010) provedli analýzu nutričního složení u *Foeniculum vulgare*. Pro stanovení cukrů použili metodu HPLC/RI (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem indexu lomu) a pro stanovení mastných kyselin metodu GC-FID (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem).

Několik studií se také zabývá genetickým inženýrstvím. Luštinec a Žárský (2005) uvádí použití explantátových kultur k přípravě transgenních rostlin. Jedním z nejstarších způsobů stabilní transformace rostlin cizorodou DNA je vnesení této DNA do jaderného genomu protoplastů působením polyethylenglykolu. Nejčastěji používaným způsobem transformace je společná kultivace explantátů s *Agrobacterium*, které nese na Ti plasmidu transgen. *Daucus carota* (mrkev obecná) z čeledi *Apiaceae* je považována za modelový druh pro explantátové kultury. Hojně se používá pro genetické modifikace s použitím vektorových i nevectorových metod. Jiné druhy z čeledi *Apiaceae* byly transformovány primárně s použitím *Agrobacterium* s tím, že *A. tumefaciens* byl použit méně často než *A. rhizogenes*. S *Agrobacterium tumefaciens* byly kultivovány pouze *Apium graveolens* (miřík celer), *Carum carvi* (kmín kořený), *Coriandrum sativum* (koriandr setý) a *Pimpinella anisum* (bedrník anýz), (Baranski, 2008). Mugnier (1988) inokuloval části stonku rostlin *Foeniculum vulgare* starých 1-2 měsíce s kmenem A4. Nově vznikající kořeny („hairy roots“) byly vyříznuty po 3-4 týdnech a dále pěstovány na 2% MS médiu bez růstových regulátorů, s přidavkem 500 mg/l carbenicillinu nebo 250 mg/l cefotaximu k zabití bakterií. Takto geneticky transformované kořenové kultury mohou produkovat vyšší hladiny sekundárních metabolitů. Nabízí se obrovský potenciál i pro zavedení dalších genů ke změně metabolických drah, produkci těchto sekundárních metabolitů a dalších zajímavých sloučenin (Giri a Narasu, 2000).

Za zmínku stojí i stanovení obsahu DNA a AT/GC genomového poměru u čeledi *Apiaceae*. Procházková (2010) v rámci své diplomové práce změřila 79 taxonů z uvedené čeledi pomocí průtokové cytometrie. Uvádí, že kvalita měření byla do jisté míry ovlivněna vysokým obsahem sekundárních metabolitů u některých druhů (*Myrrhis odorata* (čechřice vonná), *Carum carvi*, *Angelica sylvestris* (andělíka lesní)). Bylo zjištěno, že rod *Angelica* patří svou velikostí genomu v rámci čeledi spíše mezi větší a mezi měřenými druhy byl rozdíl v obsahu DNA téměř 1,5násobný.

2.4.1 Explantátové kultury

Nezastupitelné místo v biotechnologických metodách mají také explantátové kultury (Hradilík, 2005). Explantátovou kulturou rozumíme aseptickou kultivaci rostlin, nebo jejich částí v kontrolovaných podmínkách na sterilních živných půdách. Jedná se většinou o části rostlin uměle oddělené od celistvé rostliny a pěstované v podmínkách *in vitro*.

Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny (Kováč, 1995).

2.4.1.1 Historie explantátových kultur

První krok směrem k explantátovým kulturám udělal Henri-Louis Duhumel du Monceau v roce 1756 (Smith, 2013). Během jeho studie, zaměřené na hojení ran u rostlin, pozoroval formování kalusu. Za zmínku stojí i mikroskopické studie vedoucí k vývoji buněčné teorie, které prováděli Schleiden v roce 1838 a Schwann v roce 1839.

Někteří badatelé považují teoretický počátek kultur rostlinných explantátů u Klebse (rok 1887), který studoval životní projevy jednotlivých buněk vláknitých řas izolovaných z vlákna plazmolytickou macerací (Hradilík, 2005). Vyslovil domněnku, že podobné pokusy by se také mohly podařit na materiálu z vyšších rostlin semenných.

Roku 1893 uveřejnil Rechinger výsledky pokusů s pěstováním fragmentů různých částí rostlin v umělých podmínkách (Hradilík, 2005). Poprvé použil živný roztok v kulturách *in vitro*.

Nesmíme opomenout ani Haberlandta (rok 1902), který experimentoval s izolovanými fotosyntetizujícími buňkami listů a dalšími funkčně diferenciovanými buňkami (Smith, 2013). Byl neúspěšný, nicméně předpověděl, že by bylo možné kultivovat umělá embrya z vegetativních buněk.

První tzv. pravé explantátové kultury získal Gautheret roku 1934 z kambiálního pletiva *Acer pseudoplatanus* (javor klen), (Smith, 2013). Dlouhodobé kultury kořenových špiček klíčnicích rostlin rajčete se podařily udržet Whiteovi (1934) a to po přidavku kvasničného extraktu k živné půdě. Tyto kultury se podařilo udržet po 350 pasážích více než 7 let (Hradilík, 2005).

Od této doby až po současnost byly a jsou prací tisíců badatelů na celém světě získávány nové poznatky a je již jen málo rostlinných druhů, u kterých by nebyla explantace propracována (Hradilík, 2005).

2.4.1.2 Využití a možnosti aplikace explantátových kultur

Explantátové kultury představují nejen soubor metod pro vědecké studium, ale jsou využívány i pro praktické účely. Hradilík (2005) uvádí následující možnosti aplikace:

- kultivace vegetačních vrcholů a pupenů či indukce adventivních pupenů na izolovaných orgánech jako metody vegetativního množení rostlin
- kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí
- překonání fyziologických bariér při hybridizaci taxonomicky vzdálených druhů pomocí kultivace izolovaných embryí
- regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách *in vitro*
- produkce haploidů při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíček
- spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin
- řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů
- inkorporace cizího genetického materiálu do buňky s cílem modifikace rostlinného genomu
- využití rostlinných explantátů pro průmyslovou produkci sekundárních metabolitů a biologicky aktivních látek.

Máchová a kol. (2012) uvádí, že mikropropagace představuje vhodnou technologii pro konzervaci ohrožených genotypů i rychlé získání dostatečného množství klonového sadebního materiálu pro případnou repatriaci ohrožených druhů rostlin na původní stanoviště. Hlavní přínos mikropropagace je vznik geneticky identických kopií, mohou být vybrány jen žádoucí rostliny, z kterých může být vypěstováno tisíce klonů. Rostliny v *in vitro* podmínkách vykazují celoroční produkci a je možné klonovat pouze samičí nebo samčí rostliny (Smith, 2013).

2.4.1.3 Techniky explantátových kultur

K tradičním způsobům vegetativního množení se v posledních desetiletích řadí metoda tkáňových kultur – tzv. mikropropagace (Hradilík, 2005). Jsou však známy i kalusové

a buněčné suspenzní kultury, kultury rostlinných protoplastů a somatická hybridizace, prašnickové kultury, somatická embryogeneze, kultury mikrospor, oplození *in vitro*, kultivace embryí nebo kryoprezervace.

Velmi důležitou metodou se jeví i ozdravování rostlin. Technika meristémových kultur může být použita v situaci, kde je rostlina infikována virovým, bakteriálním nebo houbovým patogenem (Grout, 1999). Virová kontaminace je vysoká zvláště u rostlin vznikajících klonovým množením. Infikace viry má za následek zpomalení růstu, nekrózu, stáčení listů, snížení výtěžku až smrt rostliny (Smith, 2013). Základem ozdravování pomocí meristémových kultur je odběr koncové části meristému z vrcholového nebo laterálního pupenu nad zónou cévní diferenciace, kdy je nepravděpodobné, že by tato odebraná část obsahovala patogeny. Z vyříznutého explantátu, který je malé velikosti (často menší než 1 mm) a je kultivovaný *in vitro* může být odvozená kultura bez nežádoucích patogenů (Grout, 1999). Virózy je možné eliminovat také působením vyšší teplot, tzv. termoterapie (Hradilík, 2005). Nesi a kol. (2011) zkombinovali metodu meristémových kultur spolu s ozdravováním pomocí termoterapie u rodu *Lilium* (rod lilie). Explantáty vystavovali po různě dlouhou dobu teplotám 35°C.

2.4.1.4 Mikropropagace

Metoda pro získání velkého počtu klonů explantátů za poměrně krátkou dobu se nazývá mikropropagace. Tuto metodu použil v roce 1960 George Morel pro produkci rostlin orchidejí na komerční úrovni (Bhatia a kol., 2015). Nejčastěji klonovanými rostlinami jsou *Ficus* (fíkovník), *Syngonium*, *Spathiphyllum* (lopatkovník), *Gerbera* (gerbera), *Solanum tuberosum* (lilek brambor) a *Fragaria* (jahodník). Světová produkce mikropropagovaných rostlin je odhadována na 600 miliónů rostlin, nejčastěji v kategoriích pokojových a řezaných květin a ovocných stromů (Dixon a Gonzales, 2003).

Tento typ klonového množení může probíhat několika způsoby. Rozlišujeme stimulaci axilárního větvení, somatickou embryogenezi a tvorbu adventivních prýtů (Hradilík, 2005). Dále rozlišujeme přímou a nepřímou organogenezi. V případě nepřímé organogeneze se na řezných stranách explantátu tvoří kalus, který vzniká dediferenciací. Velkou roli sehrávají rostlinné fytohormony. U přímé organogeneze se výhonky tvoří přímo z primárního explantátu, bez tvorby kalusu (Bhatia a kol., 2015). Abd-Allah a kol. (2015) uvádí, že mikropropagace u *Foeniculum vulgare* formou přímé organogeneze je vzácná, používá se méně často než nepřímá organogeneze.

Ke stimulaci axilárního větvení jsou využívány terminální nebo axilární pupeny. Asepticky vypreparovaný vzrostlý vrchol může regenerovat v jeden nebo několik nových prýtů v závislosti na kultivačních podmínkách (Hradilík, 2005). Apikální dominance je potlačena působením vysoké koncentrace cytokininů a je tak umožněn další vývoj axilárních pupenů (Bhatia a kol., 2015). Stimulace axilárního větvení je relativně pomalá technika, avšak její významnou předností je genetická stabilita regenerantů (Hradilík, 2005).

Somatická embryogeneze je proces, při kterém vzniká úplná rostlina, případně embryo z jiné buňky než z oplozeného vajíčka, respektive zygoty (Hradilík, 2005). K indukci somatické embryogeneze u mrkve (*Daucus carota*) a jiných druhů, musí být kalus umístěn na médium obsahující auxin. Po této kultivaci pak další vývoj probíhá na médiu bez auxinu. Proces vyžaduje přítomnost dusíku v redukované formě (Smith, 2013), často zvýšený obsah aminokyselin, kokosového mléka nebo hydrolyzátu kaseinu (Hradilík, 2005). Množení rostlin pomocí somatické embryogeneze má vysoký potenciál. V jedné baňce může být vyrobeno tisíce somatických embryí (Smith, 2013). Hradilík (2005) uvádí, že z 5 ml buněčné suspenze smrku lze získat až 285 rostlin a z jednoho gramu suspenze mrkve je možné získat 1000 somatických embryí. Pandey a kol. (2011) prováděli somatickou embryogenezi u *Angelica glauca*. Nejvyšší frekvenci tvorby kalusu zaznamenali u explantátů epikotyly při použití 4,0 μM kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové. Stoprocentní embryogenní kalus se tvořil z explantátů epikotyly v prostředí s 2,0 μM 6-benzyladeninu (BAP) a 2,0 μM kyseliny naftalenoctové (NAA). Vývoj sekundárních embryí byl pozorován, když byly primární embrya kultivovány na médiu MS obsahujícím 2,0 μM NAA a 2,0 μM BAP.

Adventivní orgány mohou vznikat v procesu diferenciaci z kalusu (Hradilík, 2005). Mikropropagace v tomto případě představuje opakované pasážování vegetativně vzniklých orgánů, které opět produkují adventivní orgány. Prýty, které jsou získávány touto cestou, jsou přenášeny na zakořeňovací média k vytvoření celistvé rostliny. Úspěšné je odvození rostlin pomocí listových segmentů např. u *Begonia* (begonie) nebo u *Saintpaulia ionata* (kapská fialka).

Mikropropagaci můžeme rozdělit do pěti stádií. První – stádium 0 neboli přípravná fáze zahrnuje výběr vhodných rostlin, které mají požadované znaky pro jejich množení ve velkém měřítku (Bhatia a kol., 2015). Rostliny jsou pěstovány v kontrolovaných podmínkách prostředí s relativní vlhkostí okolo 70 %, teplotou nejčastěji 25 °C a metodou

zavlažování pomocí pískových záhonů nebo tenkých pramínek vody, nepoužívá se horní zavlažování (Dixon a Gonzales, 2003).

Stádium 1 – odvození aseptické kultury. Tato fáze může být náročná z důvodu výskytu kontaminací a produkce fenolických sloučenin u explantátu. Hlavním cílem je optimalizování dezinfekčního protokolu a živného média pro přežití a růst explantátu (Smith, 2013). Uvádí se, že čím menší je explantát, tím je nižší riziko výskytu kontaminací (Dixon a Gonzales, 2003). Existuje velké množství látek, které se používají ke sterilizaci rostlinného materiálu, např. chlornan sodný, chlorid rtuťnatý nebo 70% ethanol s různou dobou působení a to buď v kombinaci nebo samostatně, v závislosti na stupni kontaminace (Bhatia a kol., 2015). Mezi faktory, které snižují účinnost sterilizace, řadíme přítomnost trichomů, které zabraňují přístupu dezinfekčního roztoku až na povrch materiálu a tvorbu vzduchových bublinek (Hradilík, 2005). Pro zvýšení účinku dezinfekce můžeme použít smáčedlo, např. Tween-20, obvykle stačí 1 až 2 kapky na 100 ml činidla. Po sterilizaci by měl být explantát propláchnut 3–5krát ve sterilní vodě z důvodu odstranění dezinfekčního činidla, které může explantát poškodit (Smith, 2013). Platí, že stará a tvrdá pletiva odolávají vyšší koncentraci sterilizačního roztoku než mladá parenchymatická pletiva a meristémy (Hradilík, 2005).

Stádium 2 - fáze zmnožení explantátu. Obecně je známo, že cytokininy podporují tvorbu prýtlů z již existujících axilárních pupenů nebo z adventivních orgánů (Smith, 2013). Nejčastěji používaným cytokininem je 6-benzylaminopurin (BAP), v případě negativních výsledků můžeme použít isopentenyladenin (2iP) (Dixon a Gonzales, 2003). Interval pasážování je závislý na podmínkách kultivace, typu explantátu, rostlinném druhu a bývá obvykle 4 až 5 týdnů. Pasážování se provádí pravidelně a jeho cílem je přenést explantát do nového prostředí zbaveného rostlinných exkretů, které explantát naprodukoval a které by mohly negativně ovlivnit další růst (Hradilík, 2005). Smith (2013) uvádí, že kultura může být pasážována až šestkrát. Větší počet pasážování zvyšuje pravděpodobnost vzniku rostlin s nežádoucími znaky (vitifikace).

Stádium 3 – zakořeňování *in vitro* a regenerace explantátů. Cílem je indukce adventivních kořenů a vytvoření kořenového systému dostačujícího k výživě nově vytvořené celistvé rostliny. Zakořeňování prýtlů ve sterilních podmínkách je pracné, kořeny takto vzniklé mohou být nefunkční nebo postrádají kořenové vlásky (rhiziny), jsou často křehké a lámavé (Hradilík, 2005). Většina rostlinných druhů vyžaduje k indukci zakořeňování auxiny, jako NAA nebo IBA v koncentracích v rozmezí 0,1-1 mg/l. Pro eliminování účinků

cytokininů se může využít absorpce pomocí aktivního uhlí (Dixon a Gonzales, 2003). Pro zakořeňování je někdy doporučováno poloviční médium s redukováným obsahem makro a mikro elementů. Nižší koncentrace živin v médiu může představovat určitý stres a iniciovat intenzivní tvorbu adventivních kořenů (Hradilík, 2005).

Stádium 4 - převod do nesterilních podmínek. Zakořeněné explantáty jsou vyjmuty z kultivační nádoby. Je potřeba důkladně vymýt agar z kořenů rostlin, jelikož zbytky agaru mohou být výborným substrátem pro růst mikroorganismů (Dixon a Gonzales, 2003). Rostliny se umístí do substrátu, což mohou být různé umělé půdy, porézní materiály jako perlit, vermikulit, směsi písku a rašeliny nebo čedičová vata (Hradilík, 2005). Jsou pěstovány při vysoké vlhkosti vzduchu a ve stínu. Obvykle po dvou týdnech, kdy jsou rostliny přivyklé na podmínky *in vivo*, mohou tolerovat více světla i nižší vlhkost (Smith, 2013).

V *in vitro* podmínkách se můžeme setkat s rostlinami, které se zdají být křehké, mají skleněný vzhled, jsou lesklé a vodou nasáklé. Tento jev označujeme jako vitrifikaci (Obr. 1) a vyznačuje se velkým intercelulárním prostorem, rostliny nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu, mají snížený počet průduchů, chloroplasty s malými grany a nedostatek škrobových zrn (Smith, 2013). Vitrifikace může být překonána přidáním vyšší koncentrace agaru, použitím růstových inhibitorů nebo spodním chlazením kultivačních nádob (Bhatia a kol., 2015).



Obr. 1: Vitřifikace u explantátu *Foeniculum vulgare*, varianta NG

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena *Angelica archangelica* (andělka lékařská) různých genotypů (Tab. 1, Obr. 2 a Obr. 10) a semena *Foeniculum vulgare* (fenykl obecný), (Tab. 2, Obr. 2).

Tab. 1: Použité genotypy *Angelica archangelica*

Označení	Původ	Sklizeň
KH1	Kraví hora, Brno, ČR	2010
KH2	Kraví hora, Brno, ČR	2009
OSIVA	EU	neuveďeno*
JIZERKA	VURV, ČR	2012
BERN	Švýcarsko	2013
A. A 01	Holice, Olomouc, ČR	2015
24/14	Oldenburg, Německo	2014

*uvedená pouze exspirace 02/2017, dodavatel Semenonline, s.r.o.

Tab. 2: Použité genotypy *Foeniculum vulgare*

Označení	Původ	Sklizeň
NG	ČR	neuveďeno*
VURV 2014	Ruzyně, ČR	2014
VURV 2015	Ruzyně, ČR	2015
SEMO	ČR	2014

*pouze č:1-0041-90013-02, jedná se o kultivar Moravský, dodavatel Nohel Garden a.s.



Obr. 2: Semena *Foeniculum vulgare* (vlevo), *Angelica archangelica* (vpravo)

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Povrchová sterilizace semen

Požadovaný počet semen od každého genotypu byl nejprve povrchově sterilizován následujícím způsobem:

- vložení semen do plastových injekčních stříkaček (objem 20 ml)
- nasátí 70% ethanolu (Obr. 11), umístění injekčních stříkaček na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min), (Obr. 12)
- odstranění ethanolu
- nasátí 5% chloraminu T na 30 nebo 40 minut, nebo 36% roztoku sava, umístění injekčních stříkaček na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min)
- přenesení injekčních stříkaček do aseptického prostředí flowboxu
- odstranění chloraminu / sava
- opláchnutí konců stříkaček 96% ethanolem
- promývání semen ve sterilní destilované vodě 3x po dobu 1 min.

Působení sterilizačních roztoků se lišilo v závislosti na použité variantě (Tab. 3 a 4).

Tab. 3: Sterilizace semen *Foeniculum vulgare*

Označení	70% ethanol (min)	5% chloramin T (min)	Použití PPM (0,1 %)
NG	10	30	-
VURV 2014	10	30	-
VURV 2014	10	30	Ano
VURV 2014	15	40	-
VURV 2014	15	40	Ano
VURV 2015	10	30	-
VURV 2015	10	*	-
SEMO	10	30	-

*místo 5% chloraminu T byl použit 36% roztok sava (30 min)

Tab. 4: Sterilizace semen *Angelica archangelica*

Označení	70% ethanol (min)	5% chloramin T (min)
KH1	10	40
KH2	10	40
OSIVA	10	40
JIZERKA	10	40
JIZERKA	10	30
BERN	10	30
A. A 01	10	30
24/14	10	30

3.2.2 Oživování semen

U vybraných semen *Angelica archangelica* (JIZERKA, OSIVA, KH1, KH2) bylo provedeno oživování semen pomocí dvou roztoků GA₃.

Roztok č. 1 byl připraven rozpuštěním 10 mg GA₃ v 0,5 ml 96% ethanolu a 50 ml destilované vody. Roztok č. 2 vznikl rozpuštěním 5 mg GA₃ a 2 g KNO₃ v 100 ml destilované vody. Doba působení roztoku na semena činila 19 hod v případě roztoku č. 1 a 45 min u roztoku č. 2.

3.2.3 Výsev semen

Vysterilizovaná semena byla vyseta na médium MS, OK nebo na filtrační papír zvlhčený 5 ml sterilní vody. U varianty VURV 2014 bylo z důvodu velkého množství vnitřních kontaminací médium OK doplněné o Plant Preservative Mixture (PPM, 1 ml na 1 l média). Petriho misky (60, 90 mm) byly uzavřeny parafilmem a umístěny do termostatu (25 °C, tma).

3.2.4 Izolace a kultivace embryí u *Angelica archangelica*

K izolaci, která probíhala v laminárním boxu, byla použita předem vysterilizována semena.

Postup izolace embryí:

- semena byla přenesena na podložní sklíčko pod binokulární lupu (OLYMPUS SZ51)
- pomocí preparační jehly bylo natrhnuo osemení a embryo bylo vypreparováno (Obr. 13)
- embryo nalepené na jehle bylo přeneseno na médium MS nebo OK do Petriho misky (60 mm)

- misky byly uzavřeny parafilmem (Obr. 15) a umístěny do termostatu (25 °C, tma).

3.2.5 Kultivace rostlin

Po vyklíčení semen byly semenáčky přeneseny z Petriho misek pomocí pinzety na sterilní filtrační papír. Následně byl odříznut kořínek a nadzemní část byla přenesena do Erlenmeyerovy baňky obsahující médium určené k multiplikaci. Explantáty v baňkách byly umístěny do kultivační místnosti s denním režimem 16/8 h den/noc a teplotou 22±2 °C.

Ke kultivaci bylo použito pět různých variant médií (OK, MS, 1F, IAA a IBA), které se lišily koncentrací růstových regulátorů a obsahem sacharózy (složení uvedené v Tab. 5 a 6). Média OK a MS byla použita ke kultivaci explantátů na Petriho miskách, médium 1F bylo použito k multiplikaci a média IAA a IBA k indukci zakořeňování. Média byla připravena následujícím způsobem: Do 500 ml destilované vody bylo vsypáno 7,0 g agaru (Duchefa Biochemie) a rozvařeno v mikrovlnné troubě (cca 5 min). Za stálého míchání na magnetické míchače (Heidolph MR Hei-Standard) bylo ve 400 ml destilované vody rozpuštěno 4,405 g média MS (Duchefa Biochemie, složení uvedené v Tab. 18), 20 g sacharózy (PENTA) do média OK nebo 30 g sacharózy do média MS, 1F, IAA a IBA, případně byly přidány růstové regulátory a další látky (viz Tab. 5). Oba objemy byly smíchány a doplněny destilovanou vodou do objemu 1000 ml. pH bylo upraveno na 5,8 pomocí 1M hydroxidu sodného. Připravené médium bylo rozlito do Erlenmeyerových baněk (100 ml) a sterilizováno v autoklávu (teplota 121 °C, přetlak 100 kPa) po dobu 30 min.

Tab. 5: Složení kultivačních médií

Označení médií	Médium MS (g/l)	Sacharóza (g/l)	IBA (mg/l)	BAP (mg/l)	Kyselina askorbová (mg/l)
MS	4,405	30	-	-	-
OK	4,405	20	0,01	0,01	20
1F	4,405	30	0,1	1	20

Tab. 6: Složení kultivačních médií k indukci tvorby kořenů

Označení média	Médium MS (g/l)	Sacharóza (g/l)	IBA (mg/l)	IAA (mg/l)
IAA	4,405	30	-	0,1
IBA	4,405	30	0,1	-

3.2.6 Pasážování

Ve sterilním prostředí flowboxu byly pomocí skalpelu a pinzety odděleny jednotlivé rostliny, byly odřezány nekrotizované části, případně kalus na bázi a rostliny byly přeneseny na nové kultivační médium. Pasážování probíhalo v intervalech 4-5 týdnů.

3.2.7 Převod do nesterilních podmínek

U explantátů, které zakořenily na médiích IAA a IBA došlo k vyměnění alobalového víka za potravinářskou fólii a rostliny byly nadále uchovávány v kultivační místnosti s denním režimem 16/8 h den/noc a teplotou 22±2 °C.

Po týdenní kultivaci byly explantáty vyjmuty z kultivačních nádob, z kořínků byly opatrně odstraněny zbytky média pod tekoucí vodou, byly odstraněny staré listy, případně došlo ke zkrácení dlouhých kořenů. Takto připravené rostliny byly přeneseny do perlitu nebo rašelinových tablet, tzv. jiffů, které byly před použitím namočené ve vodě. Rostliny byly umístěny do minipařeniště (Obr. 9), z důvodu lepší aklimatizace na změněné podmínky.

4 VÝSLEDKY

Jedním z cílů bakalářské práce bylo optimalizování metody mikropropagace a odvození *in vitro* kultury u rodu *Angelica* a *Foeniculum*. Experimenty probíhaly na Oddělení tkáňových kultur a rostlinných biotechnologií Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období od května 2015 do dubna 2016.

4.1 Povrchová sterilizace

Experimenty byly prováděny ve 3 opakováních. Výskyt kontaminací (%) je průměrem zjištěných hodnot ze všech opakování. Pro zvýšení účinku sterilizace byla semena v injekčních stříkačkách (Obr. 11) umístěna na třepačku (IKA KS basic 130, 240 otáček/min), což můžeme vidět na obrázku 12.

4.1.1 Povrchová sterilizace semen u *Angelica archangelica*

Bylo vysazeno celkem 78 semen (detail semene na Obr. 10), z toho 58 semen na médium OK a 20 semen na médium MS a 110 embryí (můžeme vidět na Obr. 13) *Angelica archangelica* na médium OK. Výskyt kontaminací byl hodnocen po 14 dnech od vysazení. Výsledky uvedené v Tab. 7.

Tab. 7: Výskyt kontaminací u semen *Angelica archangelica*

Označení	Sterilizace*	Médium	Počet semen	Kontaminace (%)
KH1	10 – 40	OK	5	0,0
KH2	10 – 40	OK	5	20,0
OSIVA	10 – 40	OK	5	100,0
JIZERKA	10 – 40	OK	10	100,0
JIZERKA	10 – 30	OK	25	60,0
BERN	10 – 30	OK	5	0,0
BERN	10 – 30	MS	10	0,0
24/14	10 – 30	OK	5	100,0
24/14	10 – 30	MS	10	60,0

*sterilizace v min: 70% ethanol – 5% chloramin T

Průměrně činila kontaminace semen u rodu *Angelica archangelica* 53,9 %. Nejméně kontaminací se projevilo u varianty BERN (0,0 %) a to na médiu MS i na médiu OK. Bez kontaminací se jevila také varianta KH1. Uspokojivé výsledky vykazovala i varianta KH2 (kontaminace 20,0 %). Naopak všechny explantáty kontaminovaly u varianty OSIVA, 24/14 (médiu OK) a JIZERKA (působení 5% chloraminu T na 40 min). Při porovnání délky působení sterilizačních roztoků u varianty JIZERKA bylo zaznamenáno méně kontaminací u kratší doby působení 5% chloraminu T (30 min).

Výskyt kontaminací u embryí byl podstatně nižší. Kontaminovaly pouze dva embrya a průměrná kontaminace byla 1,8 %.

4.1.2 Povrchová sterilizace semen u *Foeniculum vulgare*

Celkem bylo vysazeno 1228 semen *Foeniculum vulgare*, 828 semen na médium OK a 400 semen na filtrační papír. K experimentům byla použita semena různého původu a různá délka působení dezinfekčních činidel (Tab. 3). Byl testován i vliv použitého materiálu pro výsev semen. V prvním případě byla semena vysazena na médium OK (Tab. 8), v druhém případě na zvlhčený filtrační papír (Tab. 9). Hodnocení probíhalo po 12 dnech od vysazení.

Tab. 8: Vliv použité sterilizace na výskyt kontaminací u semen vysazených na médium OK

Označení	Sterilizace*	0,1% PPM	Počet semen	Kontaminace (%)
NG	10 – 30	-	108	16,7
VURV 2014	10 – 30	-	160	26,3
VURV 2014	10 – 30	+	100	2,0
VURV 2014	15 – 40	-	100	33,0
VURV 2014	15 – 40	+	100	4,0
VURV 2015	10 – 30	-	60	51,7
VURV 2015	10 – 30**	-	50	70,0
SEMO	10 – 30	-	150	0,7

*sterilizace v min: 70% ethanol – 5% chloramin T

**sterilizace v min: 70% ethanol – 36% savo

Dle výsledků uvedených v tabulce č. 8 je patrné, že nejméně kontaminací (0,7 %) bylo zaznamenáno u varianty SEMO. Sterilizace 70% ethanolem po dobu 30 min a 5% chloraminem T po dobu 30 minut byla dostačující a proto nebyly jiné způsoby sterilizace v tomto případě testovány.

U varianty VURV 2015 se sterilizace 70% ethanolem po dobu 10 min a 5% chloraminem T po dobu 30 min jevila jako neúčinná, kontaminace semen byla 51,7 %. Byl navržen nový typ sterilizace, působení 70% ethanolu (10 min) a 36% roztoku sava (30 min), avšak kontaminace byly ještě vyšší (70,0 %). Nejvíce kontaminací ze všech testovaných variant se vyskytovalo u VURV 2015 (Obr. 3), bylo tedy rozhodnuto, dále s těmito semeny nepracovat.



Obr. 3: Vnitřní kontaminace, semena *Foeniculum vulgare* VURV 2015, médium OK, foceno po 14 dnech od vysazení

V případě varianty VURV 2014 byly testovány čtyři možnosti povrchové sterilizace. Bylo zjištěno, že přidání 0,1% PPM do kultivačního média výrazně snižuje výskyt kontaminací. U sterilizace 70% ethanolem (10 min) a 5% chloraminem T (30 min) s použitím 0,1% PPM klesla kontaminace o 24,3 % oproti stejné době působení sterilizačních roztoků, ale bez PPM. Při použití 70% ethanolu na 15 min a 5% chloraminu T na 40 min spolu s 0,1% PPM byla kontaminace nižší o 29,0 % (opět oproti použití bez PPM).

U varianty NG byla kontaminace 16,7 % při sterilizaci 70% ethanolem (10 min) a 5% chloraminem T (30 min). Jiný typ sterilizace nebyl testován.

Tab. 9: Vliv použité sterilizace na výskyt kontaminací u semen vysazených na filtrační papír

Označení	Sterilizace*	Počet semen	Kontaminace (%)
NG	10 – 30	50	6,0
VURV 2014	10 – 30	100	14,0
VURV 2014	15 – 40	100	13,0
SEMO	10 – 30	150	2,0

*sterilizace v min: 70% ethanol – 5% chloramin T

Nejméně kontaminací bylo opět zaznamenáno u varianty SEMO (2,0 %). Semena VURV 2015 byla v úvodních experimentech vyřazena pro vysoké procento kontaminací na médiu OK a na filtrační papír nebyla již vysazena.

4.2 Klíčivost

Experimenty byly prováděny ve 3 opakováních. Zjištěná klíčivost (%) je průměrem získaných hodnot ze všech opakování.

4.2.1 Klíčivost semen a embryí u *Angelica archangelica*

Po 14 dnech od vysazení proběhlo hodnocení klíčivosti. Ze 78 vysazených semen klíčilo pouze jediné semeno z varianty BERN (Obr. 14), vysazené na médium MS a bez ovlivnění roztokem GA₃. Semena, která byla ovlivněna GA₃, neklíčila. Celková klíčivost byla tedy 1,3 %.

U izolovaných embryí nebylo zaznamenáno jejich prorůstání v rostliny (Obr. 15). Pozitivní výsledek nemělo ani ovlivnění roztokem GA₃.

Semena a embrya byla nadále ponechána v termostatu (25 °C, tma) po dobu tří měsíců a byla kontrolována v dvoutýdenních intervalech, ale nebyl zaznamenán žádný nárůst klíčivosti semen a nebylo pozorováno prorůstání embryí.

4.2.2 Klíčivost semen u *Foeniculum vulgare*

Tab. 10: Klíčivost semen vysazených na médium OK

Označení	Sterilizace*	0,1% PPM	Počet semen	Klíčivost (%)
NG	10 – 30	-	108	48,2
VURV 2014	10 – 30	-	160	28,1
VURV 2014	10 – 30	+	100	51,0
VURV 2014	15 – 40	-	100	38,0
VURV 2014	15 – 40	+	100	59,0
VURV 2015	10 – 30	-	60	18,3
VURV 2015	10 – 30**	-	50	14,0
SEMO	10 – 30	-	150	52,7

*sterilizace v min: 70% ethanol – 5% chloramin T

**sterilizace v min: 70% ethanol – 36% savo

Největší klíčivost - 59,0 % - byla zaznamenána u varianty VURV 2014 se sterilizací 70% ethanol (15 min), 5% chloramin T (40 min) a 0,1% PPM v médiu. Klíčivost nad 50 % byla také u varianty VURV 2014 (70% ethanol - 10 min, 5% chloramin T - 40 min, 0,1% PPM) a u varianty SEMO. Přijatelné výsledky byly zaznamenány také u varianty NG - 48,2 % (Obr. 16). Naopak nejmenší klíčivost byla detekována u VURV 2015 (14,0 a 18,3 %), (Tab. 10).

U semen, která vykazovala vysoké procento kontaminací (Tab. 8), byla zjištěna nízká klíčivost a naopak. Můžeme tedy usoudit, že klíčivost souvisí s výskytem vnitřních kontaminací rostlinného materiálu.

Tab. 11: Klíčivost semen vysazených na filtrační papír

Označení	Sterilizace*	Počet vysazených semen	Klíčivost (%)
NG	10 – 30	50	56,0
VURV 2014	10 – 30	100	53,0
VURV 2014	15 – 40	100	63,0
SEMO	10 – 30	150	75,3

*sterilizace v min: 70% ethanol – 5% chloramin T

Procento klíčivosti bylo vyšší u semen vysazených na filtrační papír než u semen vysazených na OK médium. U všech variant byla zjištěna klíčivost semen na filtračním papíře nad 50,0 % (Tab. 11). Nejvyšší klíčivost byla zaznamenána u varianty SEMO (75,3 %). Při srovnání vlivu doby působení sterilizačních roztoků na klíčivost u varianty VURV 2014 byly zaznamenány lepší výsledky u semen s delší dobou sterilizace a to o 10,0 %.

4.3 Multiplikace u *Foeniculum vulgare*

Pro multiplikaci bylo použito médium 1F (složení uvedené v tabulce 5). Bylo hodnoceno zmnožení explantátů na tomto médiu. Během pasážování byla zaznamenána přítomnost nekrotizací a vnitřních kontaminací, které se projevily po odříznutí bazální části explantátu a přenesení explantátu na nové médium. Tyto ztráty jsou zaznamenány v tabulce 12.

Tab. 12: Ztráty explantátů způsobené vlivem kontaminace a nekrotizace během multiplikace

Označení	Počet explantátů*	Kontaminace*	Nekrotizace*
NG	29	12	-
VURV 2014	23	21	-
VURV 2014 0,1% PPM	13	6	-
SEMO	76	42	3

*hodnoty uvedené v kusech

U varianty VURV 2014 jsme se od začátku experimentů potýkali s vnitřními kontaminacemi, které se projevily i po přepasážování explantátů na médium 1F. V případě přidání 0,1% PPM do kultivačního média byly ztráty vlivem kontaminace podstatně menší.

Celkově 76 explantátů vysazených na médium 1F u varianty SEMO je dáno součtem explantátů vyklíčených na filtračním papíře a na médiu OK. V případě použití filtračního papíru bylo do Erlenmayerových baněk přeneseno 40 explantátů, z toho u 34 kusů (85,0 %) se projevily vnitřní kontaminace a nekrózy nebyly zaznamenány. U explantátů kořenicích na médium OK bylo během pasážování detekováno méně ztrát vlivem kontaminací (pouze 8 kusů - 22,2 %) a u tří kusů (8,3 %) byly pozorovány nekrózy.

Explantáty byly pasážovány ve 4-5 týdenních intervalech vždy na čerstvé médium 1F. U varianty VURV 2014 a NG proběhly 3 pasáže, u varianty SEMO a VURV 2014 0,1% PPM 2 pasáže. Zmnožení rostlin bylo zaznamenáno až po druhé pasáži. Koeficient zmnožení byl pro lepší srovnání u všech variant přepočítán na 8 týdnů.

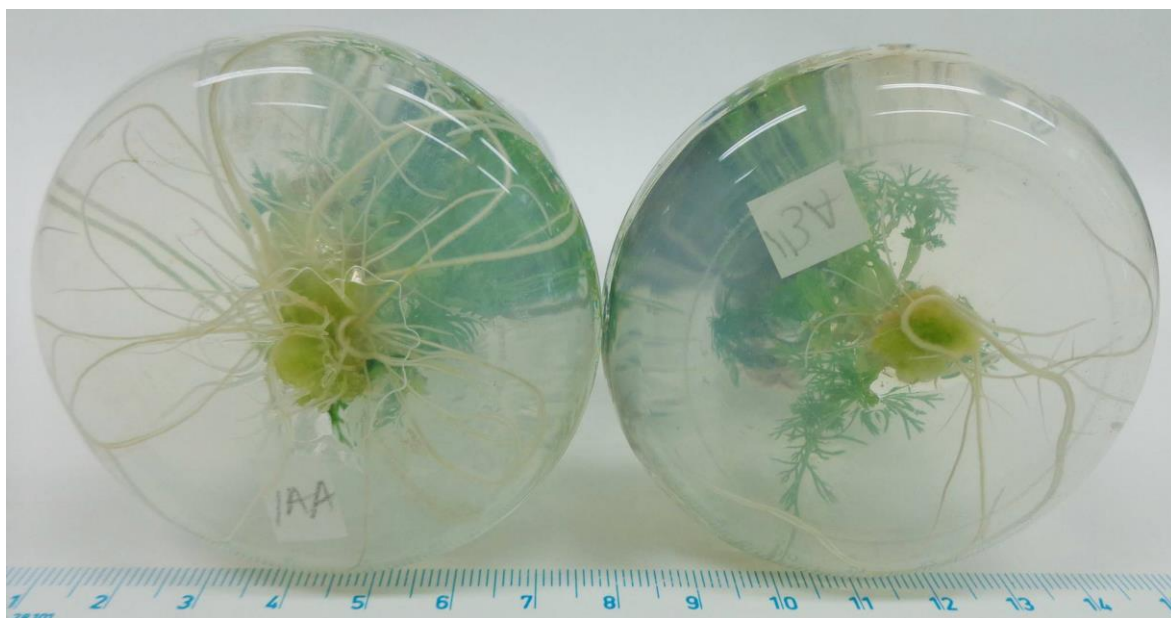
Tab. 13: Zmnožení explantátů po 8 týdnech na médiu 1F

Označení	Zmnožení
NG	10,5
VURV 2014	11,0
VURV 2014 0,1% PPM	3,4
SEMO	4,4

Použité médium 1F se jevílo pro multiplikaci jako optimální. Zmnožení u varianty NG a VURV 2014 bylo srovnatelné. Varianta SEMO a VURV 2014 s 0,1% PPM v médiu vykazovala menší koeficient zmnožení. U pěti (6,6 %) rostlin z varianty SEMO bylo zaznamenáno kořenění. U více než 50,0 % explantátů byl pozorován vznik kalusu na bázi.

4.4 Zakořeňování *in vitro* u *Foeniculum vulgare*

Po vyhodnocení multiplikace byly explantáty přeneseny na médium určené k zakořeňování. Byly vybrány dva typy médií: IAA a IBA, lišící se přítomností jiného růstového regulátoru, konkrétně auxinu (přesné koncentrace uvedeny v tabulce 6). Vliv obou médií na tvorbu kořenů (Obr. 4) byl hodnocen po 4 týdnech kultivace, výsledky uvedené v Tab. 14.



Obr. 4: Kořenící rostlinky *Foeniculum vulgare*, varianta NG, vlevo na médiu IAA, vpravo na médiu IBA, foceno po 4 týdnech kultivace

Tab. 14: Tvorba kořenů u explantátů *Foeniculum vulgare* na médiu IAA a IBA

Označení	IAA (%)	IBA (%)
NG	65,9	83,3
VURV 2014	100,0	100,0
SEMO	78,3	100,0

Celkově kořenilo 72,9 % explantátů na médiu IAA a 90,1 % explantátů na médiu IBA. Bylo zjištěno, že médium IBA je vhodnější pro indukci zakořeňování u *Foeniculum vulgare*, než médium IAA.

Rostliny byly bez nekróz (Obr. 17), objevovaly se však vitifikace (Obr. 1). Byly také zaznamenány vnitřní kontaminace, které se projevíly po odřezání bazální části rostliny a jejím přenesení na zakořeňovací médium. Ztráty v důsledku vnitřních kontaminací jsou uvedeny v tabulce 15. U varianty NG se vnitřní kontaminace projevíly u 6 explantátů z celkově 41 vysazených na médiu IAA a 9 explantátů ze 42 vysazených na médiu IBA. U varianty SEMO byly zaznamenány kontaminace u 2 explantátů na médiu IAA a 6 explantátů na médiu IBA (na obě média vysazeno po 23 rostlinách). U varianty VURV 2014 se kontaminace během kultivace na zakořeňovacích médiích neprojevíly. Rostliny tvořily bohatý kořenový systém, ale tyto kořeny se málo větvíly (Obr. 18 a 19).

Tab. 15: Ztráty explantátů vlivem vnitřních kontaminací na médiu IAA a IBA

Označení	IAA (%)	IBA (%)
NG	14,6	21,4
SEMO	8,7	26,1

4.5 Převod do nesterilních podmínek u *Foeniculum vulgare*

Po dvou týdnech, kdy byly rostliny pěstovány v minipařeništi, byla hodnocena úspěšnost převodu do nesterilních podmínek.

Do perlitu bylo vysazeno celkem 32 rostlin, do rašelinových tablet 30 rostlin. Celková úspěšnost převodu do nesterilních podmínek byla 66,1 %. V perlitu se uchytilo 81,3 % rostlin, v rašelinových tabletách pak 50,0 %. Při hodnocení byly rozlišeny také

jednotlivé varianty a médium k indukci kořenění, na kterém byly rostliny kultivovány (Tab. 16 a Tab. 17).

Tab. 16: Úspěšnost převodu rostlin do perlitu

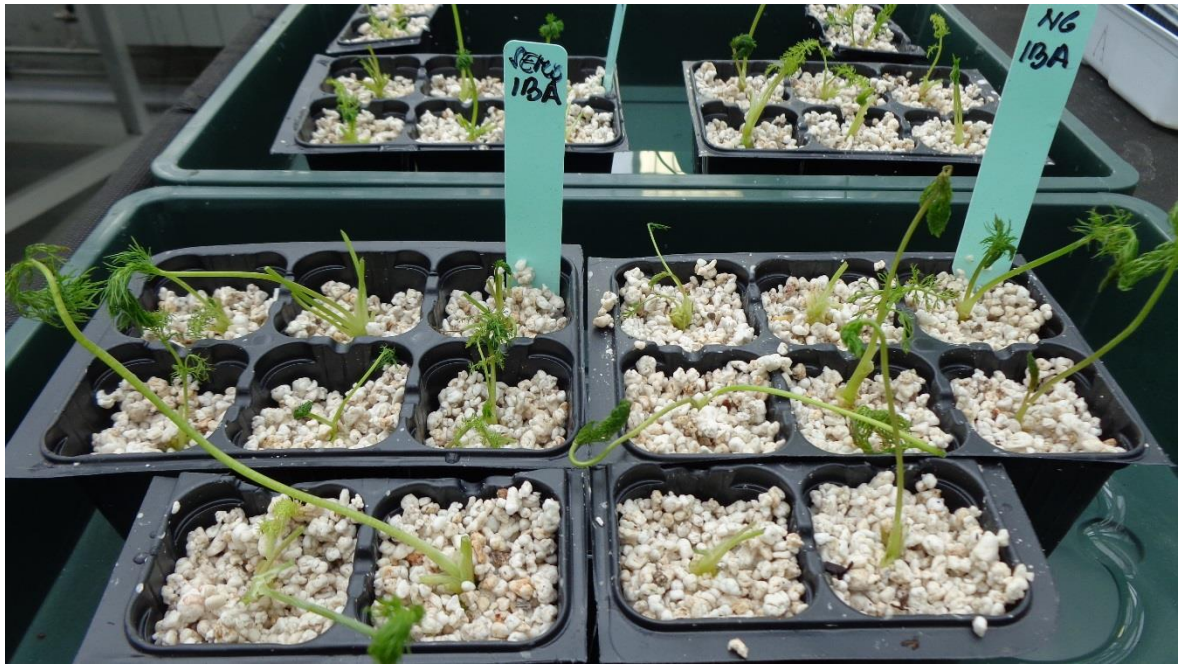
Označení	Médium	Počet vysazených rostlin / počet uchycených rostlin	Úspěšnost (%)
NG	IAA	8 / 5	62,5
NG	IBA	8 / 7	87,5
SEMO	IAA	8 / 6	75,0
SEMO	IBA	8 / 8	100,0
Celkem		32 / 26	81,3

Tab. 17: Úspěšnost převodu rostlin do rašelinových tablet

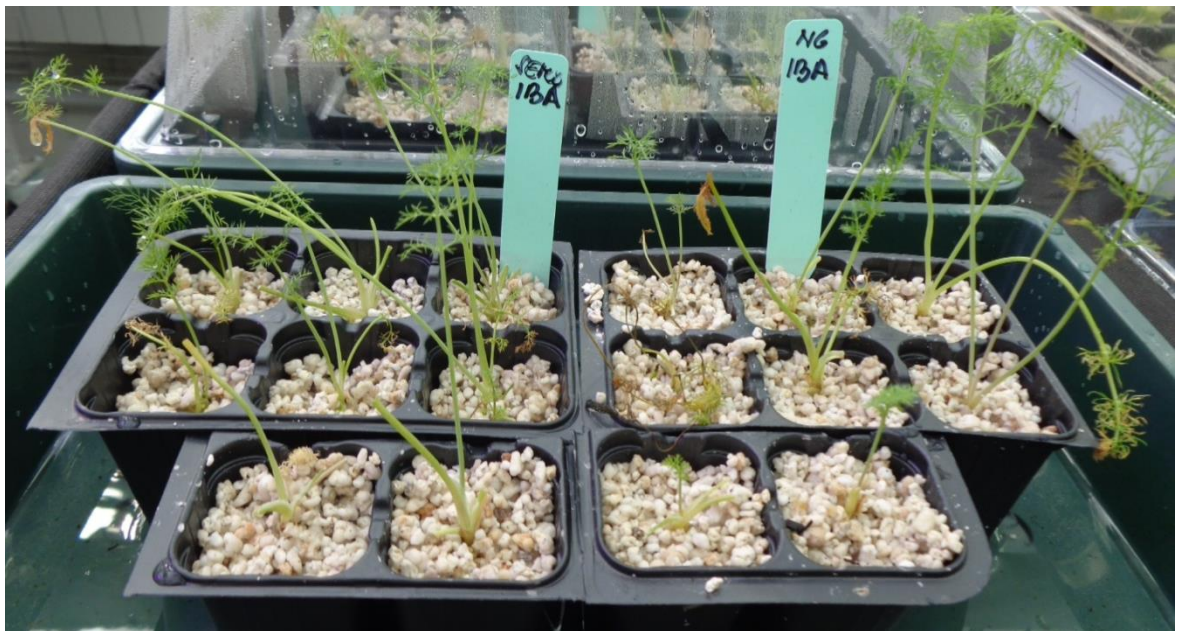
Označení	Médium	Počet vysazených rostlin / počet uchycených rostlin	Úspěšnost (%)
NG	IAA	8 / 3	37,5
NG	IBA	8 / 3	37,5
SEMO	IAA	7 / 4	57,1
SEMO	IBA	7 / 5	71,4
Celkem		30 / 15	50,0

Z výsledků je zřejmé, že perlit (Obr. 6) se jevil jako vhodnější substrát oproti rašelinovým tabletám (Obr. 8). Můžeme tedy usoudit, že *Foeniculum vulgare* preferuje substrát, který obsahuje méně živin. Také byly zaznamenány rozdíly mezi rostlinami, podle toho, na jakém kořenícím médiu byly kultivovány. U rostlin, které kořenily na médiu IBA, byla zjištěna vyšší úspěšnost přenosu, než u rostlin kořenících na médiu IAA.

Rostliny byly po přesazení do nového substrátu povadlé, jak můžeme vidět na obrázku 5 a 7. Umístění do minipařeniště (Obr. 9) se ukázalo jako efektivní, uchycené rostliny se postupně rozrůstaly a nevykazovaly známky vitifikace (Obr. 6 a 8). Rostliny, které odumřely, byly zasažené plísněmi a byla pozorovaná hniloba kořenů, což mohlo být dáno také nedostatečným vymytím agarů z kořínků rostlin.



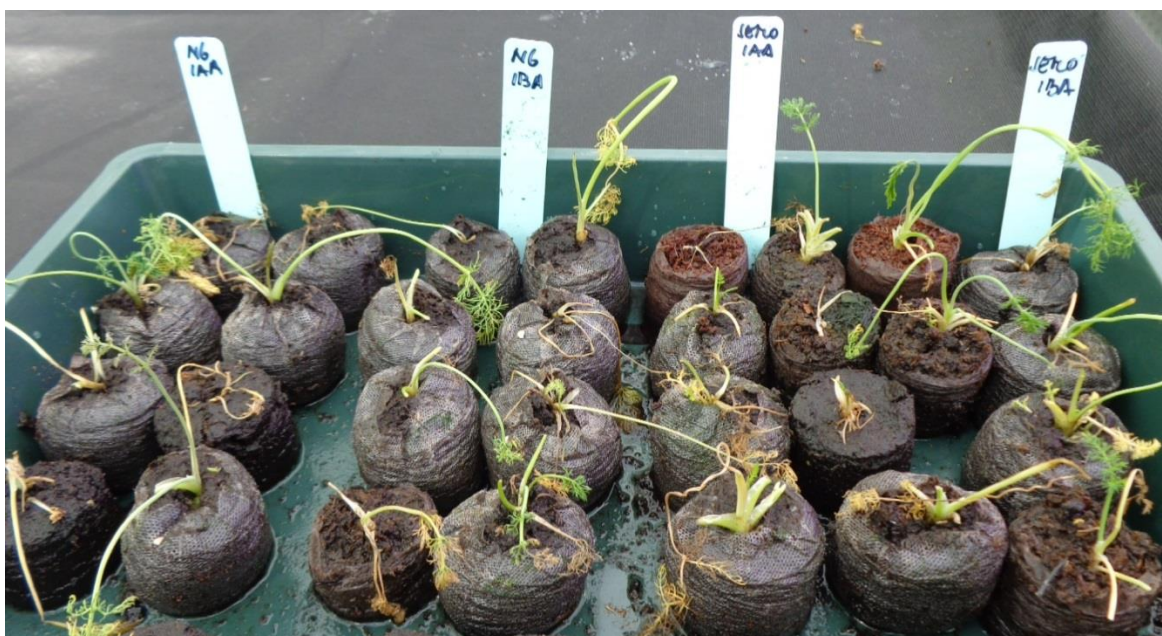
Obr. 5: Rostliny *Foeniculum vulgare*, varianta SEMO a NG, přenesené do perlitu, foceno v den přenosu do nesterilních podmínek



Obr. 6: Rostliny *Foeniculum vulgare* v perlitu, varianta SEMO a NG, foceno 14 dní od převodu do nesterilních podmínek



Obr. 7: Rostliny *F. vulgare* v tzv. jiffech, foceno v den přenosu do nesterilních podmínek



Obr. 8: Rostliny *Foeniculum vulgare* v rašelinových tabletách, foceno 14 dní od převodu do nesterilních podmínek



Obr. 9: Rostliny *Foeniculum vulgare* umístěné do minipařeniště, foceno v den přenosu do nesterilních podmínek

5 DISKUZE

5.1 Povrchová sterilizace

Velmi důležitým krokem pro založení *in vitro* kultury je sterilizace rostlinného materiálu. Eeva a kol. (2003) použili k povrchové sterilizaci semen *Angelica archangelica* 0,01% roztok chloridu rtuťnatého s dobou působení 15 min. Následovalo promytí ve sterilní vodě 3krát po dobu pěti minut. Pandey a kol. (2011) použili stejnojmenný roztok, avšak o vyšší koncentraci (0,1%) a s kratší dobou působení (5 min). Také Butola a kol. (2014) pracovali s roztokem chloridu rtuťnatého (0,04%, doba působení 1 min). Mongkolchaipak a Suchantaboot (2010) sterilizovali rhizomální pupeny pomocí orthocidu (lžíce a půl) ve 100 ml sterilní vody po dobu 30 minut, následně promýváním 5% nebo 10% roztokem Clorox s přidáním 1-2 kapek Tween 20 po dobu 5 nebo 10 minut a 2-3krát promytím ve sterilní vodě.

Saxena a kol. (2012) použili chlorid rtuťnatý (0,1%, 4 min) ke sterilizaci semen *Foeniculum vulgare*. Pupeny *Foeniculum vulgare* sterilizovali Manoir a kol. (1985) pomocí 7% roztoku chlornanu vápenatého s dobou působení 15 min. Jako sterilizační roztok je možné použít i 5% chlornan sodný na 8 min (Torabi a kol., 2014).

V našem případě jsme se chtěli vyhnout použití chloridu rtuťnatého, jelikož se jedná o prudký jed, který se může vstřebávat i kůží. Z tohoto důvodu jsme zvolili snadno dostupný 70% ethanol, který použili ke sterilizaci semen také Torabi a kol. (2014) a Abd-Allah a kol. (2015) a 5% roztok chloraminu T.

Z výsledků je zřejmé, že množství vnitřních kontaminací se lišilo v závislosti na použití jednotlivých variant semen u *Angelica archangelica* i *Foeniculum vulgare*. Hradilík (2005) uvádí, že mikrobiální kontaminace se liší v různých obdobích roku i na různých stanovištích, také záleží na podmínkách skladování. Přepokládáme, že u semen, které nebyly uchovávány v optimálních podmínkách (např. vlhko) je procento vnitřních kontaminací větší a je potřeba zvolit jiný typ povrchové sterilizace, k čemu nejúčinnější eliminaci vnitřních kontaminací.

Abd-Allah a kol. (2015) použili ke sterilizaci semen *Foeniculum vulgare* 70% ethanol na 1, 2, 3 a 4 min a komerčně dostupný 5% roztok Clorox (chlornan sodný) na 10, 15, 20, 25 a 30 min. Sterilizace ethanolem na 3 min a 5% roztokem Clorox po dobu 25 min se jevila jako vysoce účinná, klíčilo 100 % semen a nebyly zaznamenány žádné

kontaminace. Tato varianta sterilizace je další možností, jak můžeme získat kulturu bez vnitřních kontaminací.

V porovnání se semeny *Foeniculum vulgare* vysazenými na médium OK, vykazovala semena vysazená na filtrační papír méně kontaminací, což mohlo být zapříčiněno tím, že OK médium obsahuje větší množství živných látek než filtrační papír. Další možností, kterou bychom měli vzít v úvahu je fakt, že kontaminace na médium OK jsou lépe viditelné, než na filtračním papíře.

Kraj a Dolnicki (2003) uvádí, že přidání PPM přímo do kultivačního média je velmi účinné pro získání většího počtu sterilních kultur, což se potvrdilo i v našem případě. Přidáním PPM (1 ml na 1 l média) do média OK u semen *Foeniculum vulgare* varianty VURV 2014 klesl výskyt vnitřních kontaminací v průměru o 26,7 %. Rihan a kol. (2012) také prokázali účinek PPM na snižování kontaminací u kvěťáku, zjistili však, že se zvyšující se použitou koncentrací PPM klesá počet vyvinutých explantátů. Jako optimální uvádějí koncentraci PPM 0,25 ml/l. V rozporu s tímto tvrzením je Kraj a Dolnicki (2003), kteří uvádějí, že PPM nemá negativní vliv na růst a vývoj *Fagus sylvatica* L. (buk lesní). V našem případě koncentrace PPM 1 ml/l neměla negativní vliv na snížení klíčení semen, naopak jsme zaznamenali zvýšení klíčení oproti explantátům, které nebyly kultivovány na médiu doplněném o PPM. Můžeme tedy usuzovat, že stanovení optimální koncentrace PPM bez ovlivnění schopnosti růstu explantátů je závislé především na druhu rostliny.

5.2 Klíčivost

U semen rodu *Angelica* je zaznamenána nízká klíčivost, která může být způsobena dormancí (Butola a Samant, 2006). U *Angelica archangelica* je klíčivost uváděna okolo 20 % (Ojala, 1985), avšak v našem případě jsme zaznamenali klíčivost pouze 1,3 %. Dle Eeva a kol. (2003) semena uložená při teplotě 5 °C ztrácejí klíčivost po 40 měsících a semena skladována při pokojové teplotě dokonce po jednom roce, proto jsme zvolili metodu skladování semen v lednici (4 °C). Nevíme bohužel, v jakých podmínkách byla semena uchovávána předtím, což je jedním z podstatných faktorů. Významnou roli hraje také stáří semen (Butola a Samant, 2006), které se v případě jednotlivých variant použitých v našich experimentech značně lišilo (Tab. 1 – rok sklizně).

K přerušení dormance u semen rodu *Angelica* se hojně využívá chemického ošetření před výsevem například dusičnanem draselným (KNO₃), kyselinou gibberelovou (GA₃) nebo chlorečnanem sodným (NaHClO₃) (Butola a Samant, 2006; Butola a Badola, 2004).

V našem případě GA₃ neměla vliv na klíčivost semen *Angelica archangelica*. Butola a Badola (2004) uvádí, že zejména KNO₃ v koncentraci 150 mM nebo NaHClO₃ po dobu 30 min výrazně stimulují klíčení osiva a snižují také střední dobu klíčení. Pro naše další experimenty by bylo možné uvažovat o nahrazení GA₃ jiným činidlem, například tedy KNO₃ nebo NaHClO₃ k oživení semen. S nízkou klíčivostí se potýkali i Pandey a kol. (2011) u semen *Angelica glauca* vysazených na MS médium. Uvádějí, že stratifikace při teplotě 4 °C po dobu 14 dní je dostatečná k prolomení této dormance.

Je zřejmé, že podmínky prostředí - voda, teplota, osvětlení, množství kyslíku - mají do značné míry také vliv na klíčení. Výsledky studie, kterou provedl Butola a Samant (2006) ukazují, že zejména osvětlení hraje u klíčení rostlin rodu *Angelica* velkou roli. Chemické ošetření bylo méně účinné u semen, které byly kultivovány ve tmě (24 hod), než u semen kultivovaných ve světelných podmínkách (24 hod, 600 Lux). Semena a embrya *Angelica archangelica* v našem experimentu byla kultivována v termostatu (25 °C, tma). Pro větší účinek chemického ošetření pomocí GA₃ by tedy bylo vhodné semena kultivovat při světelných podmínkách.

Pandey a kol. (2011) kultivovali semena *A. glauca* na Petriho miskách obsahujících filtrační papír, což se jeví jako další možnost v případných budoucích experimentech se semeny *A. archangelica*.

Semena *Foeniculum vulgare* vykazovala dobré prorůstání v rostliny. Větší klíčivost byla zaznamenána na filtračním papíře, který použili ke klíčení i Saxena a kol. (2012), než na médiu OK (IBA 0,01 mg/l, BAP 0,01 mg/l, kys. askorbová 20 mg/l), což může být dáno zejména vyšší vlhkostí na filtračním papíře.

5.3 Multiplikace u *Foeniculum vulgare*

Jedním z ukazatelů úspěšnosti mikropropagace je koeficient zmnožení, tj. počet nových rostlin na jeden původní založený explantát. Na médiu 1F (MS; IBA 0,1 mg/l; BAP 1 mg/l; kys. askorbová 20 mg/l) jsme zaznamenali uspokojivé výsledky, koeficient zmnožení se však lišil v závislosti na použité variantě, což může být dáno rozdíly mezi jednotlivými genotypy, které potvrzují Anzidei a kol. (2000) při somatické embryogenezi. Také Torabi a kol. (2014) uvádějí, že rozdíly mezi genotypy jsou příčinou odlišných reakcí rostlin v kultivačním médiu.

Hunault a Manoir (1992) doporučují umístit explantáty na médium obohacené o 0,1 mg/l IAA a 0,1 mg/l BAP a pasážovat explantáty každý měsíc. Manoir a kol. (1985)

srovnávali vliv auxinů (IAA, IBA a NAA - 0,1 mg/l) v kultivačním médiu spolu s 0,1 nebo 0,05 mg/l BAP na míru zmnožení. Největšího zmnožení (5 nových rostlin na původní explantát za 4 týdny) bylo zaznamenáno na médiu obohaceném o 0,1 mg/l IBA a 0,05 mg/l BAP. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo v našich experimentech s variantou NG a VURV 2014 (zmnožení 10,5 a 11 / 8 týdnů). Kombinace auxinů (zejména IBA) a cytokininů (BAP) se jeví jako nejvhodnější pro úspěšnou multiplikaci u *Foeniculum vulgare*.

U explantátů jsme se během pasážování potýkali s vnitřními kontaminacemi, do budoucna by bylo možné uvažovat o přidání antibiotik do média. Hradilík (2005) uvádí například vankomycin, rifampicin, kanamycin nebo chloramfenikol. Použití antibiotik však není bez rizika, jelikož tyto látky mohou být pro rostlinné buňky toxické. Další možností je přidání PPM do kultivačního média.

K zabránění hnědnutí pletiv bylo přidáno do kultivačního média 20 mg/l kyseliny askorbové, která působí jako antioxidant (Hradilík, 2005). Toto ovlivnění bylo prospěšné, zaznamenali jsme pouze 3 nekrotizace explantátu u varianty SEMO. Také bychom mohli uvažovat o kratším intervalu mezi pasážováním explantátů na čerstvé médium, jak uvádí Hradilík (2005).

5.4 Zakořeňování u *Foeniculum vulgare*

K zakořeňování doporučují Hunault a Manoir (1992) přenést explantáty na médium bez BAP. Uvádějí, že nejlepších výsledků lze dosáhnout, pokud je v médiu přítomno 0,1 g/ml IAA nebo 0,1 g/ml IBA.

Manoir a kol. (1985) hodnotili působení IAA, IBA a NAA k indukci kořenění. Největší množství kořenících rostlin (92 %) bylo získáno na médiu obsahujícím 0,1 mg/l IAA. Použití IBA nebo NAA v koncentraci 0,1 mg/l se jeví jako méně účinné. Dospěli k závěru, že úspěšnost zakořeňování souvisí s médiem určeným k multiplikaci. Explantáty, které byly kultivovány na médiu obsahujícím auxin (IAA / BAP / NAA) o koncentraci 0,1 mg/l a 0,05 mg/l BAP vykazovaly po přenesení na kořenící médium větší procento kořenění, než explantáty kultivované na médiu s 0,1 mg/l auxinu a 0,1 mg/l BAP.

Informace, které publikoval Manoir a kol. (1985) jsou v rozporu s našimi výsledky, kdy bylo zjištěno, že explantáty lépe koření na médiu obsahujícím 0,1 mg/l IBA (90,1 %), než na médiu obsahujícím 0,1 mg/l IAA (72,9 %). Může to být dáno tím, že při multiplikaci byla použita vyšší koncentrace BAP (1 mg/l) a 0,1 mg/l IBA, kdežto Manoir a kol. (1985)

kultivovali rostliny na médiu určeném pro multiplikaci obsahujícím 0,1 mg/l IAA a 0,05 nebo 0,1 mg/l BAP. Tuto myšlenku potvrzují Manoir a kol. (1985) tvrzením, že by se mělo zabránit používání odlišných auxinů v médiu pro multiplikaci a v kořenícím médiu.

5.5 Převod do nesterilních podmínek u *Foeniculum vulgare*

K převodu rostlin můžeme použít různé typy substrátu, např. perlit, vermikulit, směsi písku a rašeliny, čedičovou vatu nebo umělé půdy (Hradilík, 2005).

Hunault a Manoir (1992) použili u *Foeniculum vulgare* malé květináče naplněné směsí rašeliny, písku a zeminy v poměru 1:1:1 a rostliny kultivovali úspěšně ve skleníku. Abd-Allah a kol. (2015) naplnili květináčky substrátem, překryli fólií k udržení vysoké vlhkosti a umístili do kultivační místnosti při teplotě 25 ± 1 °C a režimem 16/8 h den/noc. Rostliny byly vitální pouze 10 dní, nevykazovaly žádné známky růstu a po této době začínaly vadnout v důsledku nedostatečně vyvinutého kořenového systému.

V našem případě byl přenos do nesterilních podmínek úspěšný. Bylo zjištěno, že perlit je vhodnějším substrátem než rašelinové tablety. Úspěšnost přenosu rostlin do perlitu byla 81,3 %, kdežto u rašelinových tablet pouze 50,0 %. Pro získání většího počtu rostoucích rostlin můžeme uvažovat o nahrazení perlitu směsí rašeliny a vermikulitu v poměru 1:1, kterou použili pro převod Manoir a kol. (1985). Rostliny kultivovali při teplotě 22/18 °C, fotoperiodě 12/12 hod, relativní vlhkosti 60-100 % a zaznamenali 85 % úspěšnost.

Rostliny, které odumřely, byly zasažené plísněmi a byla pozorována hniloba kořenů, což mohlo být důsledkem většího množství vody v minipařeništích nebo nedostatečným vymytím agarů z kořenů rostlinek. K eliminaci plísní by bylo možné aplikovat fungicidy jak do substrátu, tak i na přesazené rostliny (Hradilík, 2005).

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá biotechnologickými metodami u rodu *Angelica* a *Foeniculum*, konkrétně mikropropagací u *Angelica archangelica* a *Foeniculum vulgare*.

- Byla vypracována literární rešerše na zadanou problematiku a na základě zjištěných informací byl navrhnout postup experimentů.
- Optimální postup pro sterilizaci semen – 70% ethanol na 10 nebo 15 minut a 5% chloramin T na 30 nebo 40 minut.
- Byl zjištěn pozitivní vliv 0,1% PPM v kultivačním médiu na snížení vnitřních kontaminací v průběhu klíčení semen.
- Semena *Foeniculum vulgare* vysazená na filtrační papír vykazovala méně kontaminací a naopak větší klíčivost než semena vysazená na médium OK (MS; IBA 0,01 mg/l; BAP 0,01 mg/l; kys. askorbová 20 mg/l).
- Byla úspěšně odvozena sterilní *in vitro* kultura u *Foeniculum vulgare*, ale u *Angelica archangelica* se *in vitro* kulturu nepodařilo odvodit.
- GA₃ neměla na klíčivost semen *Angelica archangelica* vliv.
- Médium 1F se osvědčilo pro multiplikaci u *Foeniculum vulgare* (1F - MS; IBA 0,1 mg/l; BAP 1mg/l; kys. askorbová 20 mg/l).
- Pro indukci zakořeňování je vhodnější médium IBA (MS; IBA 0,1 mg/l), než médium IAA (MS; IAA 0,1 mg/l).
- Perlit byl vhodnějším substrátem pro převod do nesterilních podmínek než rašelinové tablety (jiffy) u *Foeniculum vulgare*

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abd-Allah R. H, Abo Zeid E. M., Zakaria M. M, Eldahmy S. I. (2015) Micropropagation of wild fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) via organogenesis and somatic embryogenesis. *Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering* 7: 1-10
2. Anzidei M., Bennici A., Schiff S., Tani C., Mori B. (2000) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 69-79
3. Baranski R. (2008) Genetic Transformation of Carrot (*Daucus carota*) and Other *Apiaceae* Species. *Transgenic Plant Journal* 2: 18-38
4. Barros L., Carvalho A. M., Ferreira I. C. F. R. (2010) The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT – Food Science and Technology* 43: 814-818
5. Bhat Z. A., Kumar D., Shah M. Y. (2011) *Angelica archangelica* Linn. is an angel on earth for the treatment of diseases. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 1: 36-50
6. Bhatia S., Sharma K., Dahiya R., Bera T. (2015) *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Science
7. Butola J. S., Samant S. S. (2006) Physiological studies in seed germination of *Angelica glauca*. *Journal of Medicinal Plants* 7: 205-212
8. Butola J. S., Badola H. K. (2004) Effect of pre-sowing treatment on seed germination and seedling vigour in *Angelica glauca*, a threatened medicinal herb. *Current Science* 87: 796-799
9. Clapham A. R., Tutin T. G., Moore D. M. (1987) *Flora of the British Isles*. Ed. 3, Cambridge University Press, UK
10. Cronquist A. (1988) *The Evolution and classification of flowering plants*. Ed. 2, New York Botanical Garden, USA
11. Dixon R. A., Gonzales R. A. (2003) *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Ed. 2, Oxford University Press, UK
12. Eeva M., Ojala T., Tammela P., Galambosi B., Vuorela H., Hiltunen R., Fagerstedt K., Vuorela P. (2003) Propagation of *Angelica archangelica* plants in an air-sparged

- bioreactor from a novel embryogenic cell line, and their production of coumarins. *Biologia Plantarum* 46: 343-347
13. Fang. L., Qi M., Li T., Shao Q., Fu R. (2006) Headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spektrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 791-797
 14. Giri A., Narasu M. L. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18: 1-22
 15. Grout B. W. W. (1999) Meristem tip culture for propagation and virus elimination. *Methods in molecular biology* 111: 115-125, *Plant Cell Culture Protocols*, editoval R. D. Hall, Humana Press, Totowa, New Jersey
 16. Hradilík J. (2005) Rostlinné explantáty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
 17. Hunault G, Manoir J. D. (1992) Micropropagation of Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19: 199-217
 18. Choi E. M., Hwang J. K. (2004) Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75: 557-565
 19. Christensen L. P., Brandt K. (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the *Apiaceae* family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 683-693
 20. Jahodář L. (2011) Farmakobotanika. Karolinum, UK v Praze
 21. Korbelář J., Endris Z. (1990) Naše rostliny v lékařství. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha
 22. Kováč J. (1995) Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci
 23. Kraj W., Dolnicki A. (2003) The influence of PPM upon the sterility of the *in vitro* cultures in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72: 303-307
 24. Kresánek J. st., Kresánek J. ml. (2008) Atlas léčivých rostlín a lesných plodov. Osveta, Slovensko
 25. Luštinec J., Žárský V. (2005) Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum, UK v Praze
 26. Máchová P., Malá J., Cvrčková H. (2012) Micropropagation of *Betula nana*. *Zprávy lesnického výzkumu* 57: 202-206

27. Mamgain S. K., Goel A. K., Sharma S. C. (1998) Conservation of assessment of some important threatened medicinal plants of India. *Journal of Non-Timber Forest Products* 5: 1-9
28. Manoir J. D., Desmarest P., Saussay R. (1985) In vitro propagation of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *Scientia Horticulturae* 27: 15-19
29. Mongkolchaipak T., Suchantaboot P. (2010) Studies on Tissue Culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine* 8: 2-3
30. Muckensturm B., Foechterlen D., Reduron J.-P., Danton P., Hildenbrand M. (1997) Phytochemical and Chemotaxonomis Studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 353-358
31. Mugnier J. (1988) Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 7: 9-12
32. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum* 15: 473-497
33. Nesi B., Lazzereschi S., Pecchioli S., Grassotti A., Ruffoni B. (2011) Virus detection and propagation of virus-free bulbs from selected progenies of pollenless lilies. *Acta Horticulturae* 900: 325-331
34. Neubauer Š., Klimeš K., Černá L. (1984) *Léčivé rostliny I. Svěpomoc*, Praha
35. Niviskiene O., Butkiene R., Mockute D. (2005) The Chemical Composition of the Essential Oil of *Angelica archangelica* L. Roots Growing Wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 17: 373-377
36. Novák J., Skalický M. (2012) *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. Ed. 3, Powerprint, Praha
37. Novák J., Nováková H. (2010) *Alergenní rostliny*. Knižní klub, Praha
38. Ojala A. (1985) Seed dormancy and germination in *Angelica archangelica* subsp. *archangelica* (*Apiaceae*). *Annales Botanici Fennici* 22: 53-62
39. Pandey M., Dhar U., Samant S. S., Shirgurkar M. V., Thengane S. R. (2011) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Angelica Glauca* Edgew., a critically endangered medicinal plant of the Western Himalaya. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 86: 493-498
40. Pasqua G., Monacelli B., Silvestrini A., Manganaro R. (2001) In vitro root differentiation and essential-oil accumulation in *Angelica archangelica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 763-766

41. Pasqua G., Monacelli B., Silvestrini A. (2003) Accumulation of essential oils in relation to root differentiation in *Angelica archangelica* L. European Journal of Histochemistry 47: 87-90
42. Procházková J. (2010) Obsah DNA a AT/GC genomový poměr v čeledi *Apiaceae*. diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno
43. Rihan H. Z., Al-Issawi M., Al-Swedi F., Fuller M. P. (2012) The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. Scientia Horticulturae 141: 47-52
44. Samant S. S., Dhar U., Palni L. M. S. (1998) Medicinal Plants of Indian Himalaya: diversity, distribution, potential values. Gyanodaya Prakashan, Nainital
45. Sarker S. D., Nahar L. (2004) Natural medicine: The genus *Angelica*. Current medicinal chemistry 11: 1479-1500
46. Saxena S. N., Kothari P., Rathore S. S., Khan I. U., Saxena R. (2012) Organogenesis in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). International Journal of Seed Spices 2: 1-4
47. Singh G., Maurya S., De Lampasona M. P., Catalan C. (2006) Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. Food Control 17: 745-752
48. Smith R. H. (2013) Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Ed. 3, Academic Press, USA
49. Telci I., Demirtas I., Sahin A. (2009) Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. Industrial Crops and Products 30: 126-130
50. Torabi S., Far M. S., Omid M., Gharakhanlou H., Saffar Z. N. (2014) A survey of the best growing conditions of *in vitro* culture in fennel different genotypes for mass production. International Journal of Biosciences 5: 7-17
51. Zelený V. (2012) Rostliny středozemí. Academia, Praha
52. Zoubiri S., Baaliouamer A., Seba N., Chamouni N. (2014) Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. Arabian Journal of Chemistry 7: 480-485

Internetové zdroje:

1. Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2015 (vydáno 30. 6. 2015) Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský.
<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudah/odrudy-registrovane-v-cr/seznam-odrudy>; Staženo 28. 3. 2016

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Složení MS média

Tab. 18: Složení MS média (Murashige a Skoog, 1962)

Makroelementy	mg/l
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,00
Mikroelementy	mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Vitamíny	mg/l
Thiamin	0,10
Pyridoxin	0,50
kyselina nikotinová	0,50
Glycin	2,00
myo-inositol	100,00

sacharóza 30g/l, agar 8g/l, pH 5,8

Příloha 2: Obrazové přílohy

Všechny fotografie, kromě Obr. 10 a 13, byly pořízeny fotoaparátem SONY Cyber-shot DSC-W730. Obr. 10 a 13 byly vyfoceny fotoaparátem OLYMPUS SP 350 s použitím adaptéru na binokulární lupu (OLYMPUS SZ51).



Obr. 10: Semeno *Angelica archangelica*, zvětšení 30x



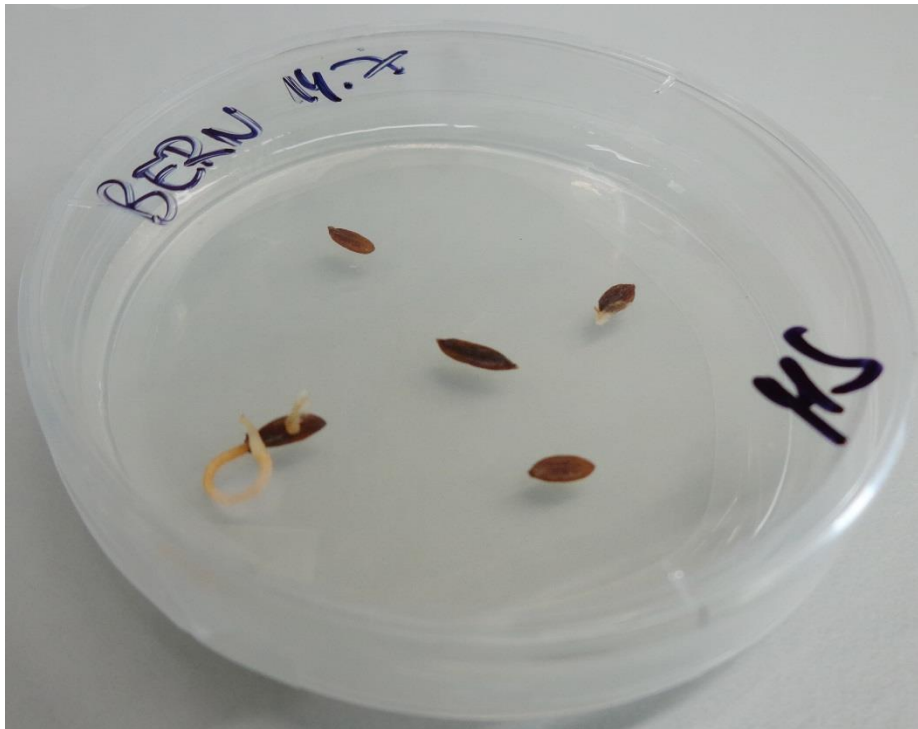
Obr. 11: Semena *Angelica archangelica* sterilizovaná pomocí 70% ethanolu



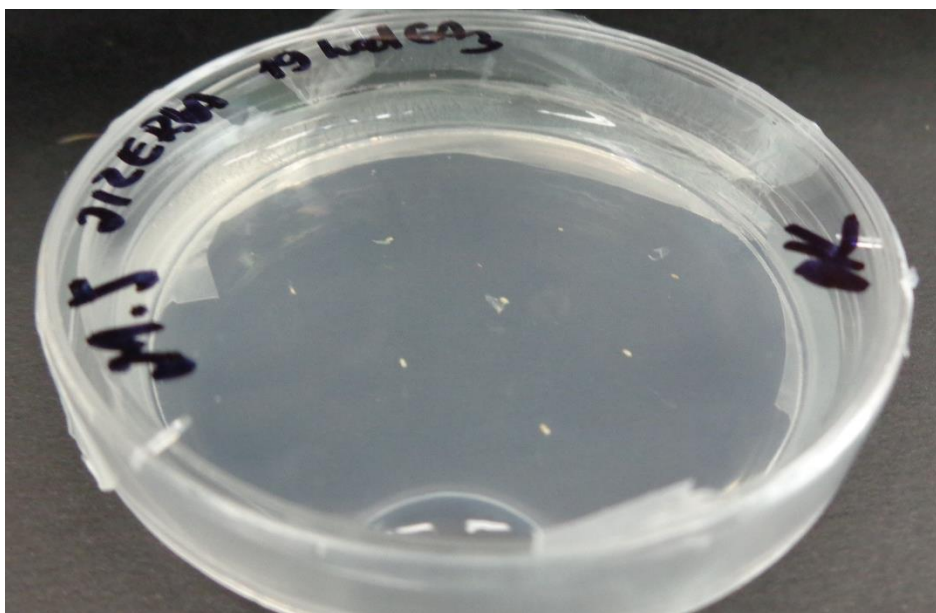
Obr. 12: Semena *Angelica archangelica* sterilizovaná v 70% ethanolu na třepačce (IKA KS basic 130, 240 otáček/min)



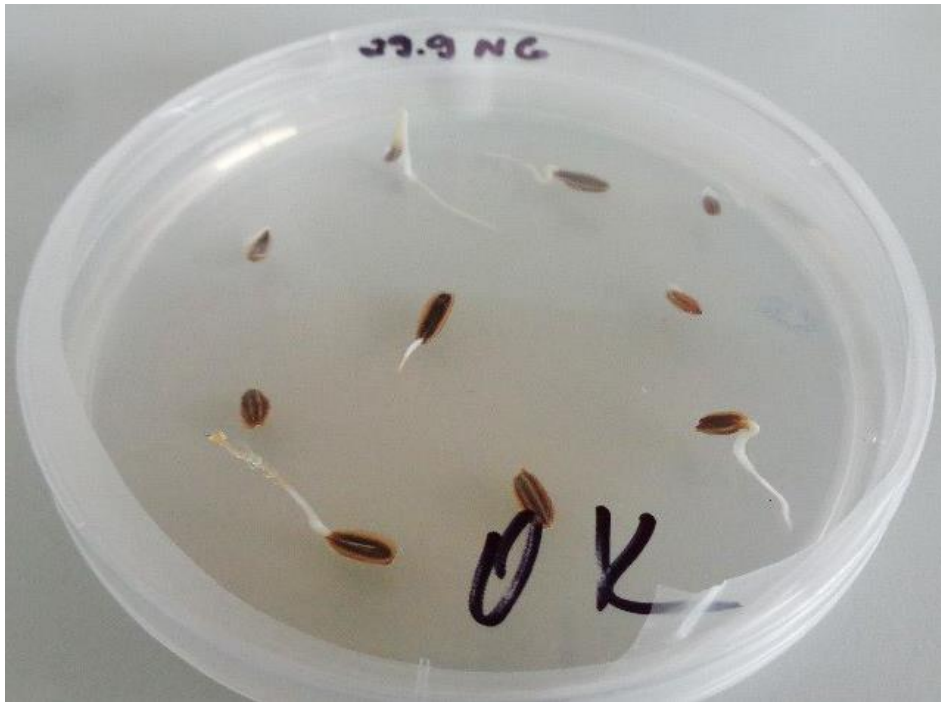
Obr. 13: Vypreparované embryo *Angelica archangelica*, zvětšení 35x



Obr. 14: Klíčící semeno *Angelica archangelica*, varianta BERN, médium MS, foceno po 14 dnech od vysazení



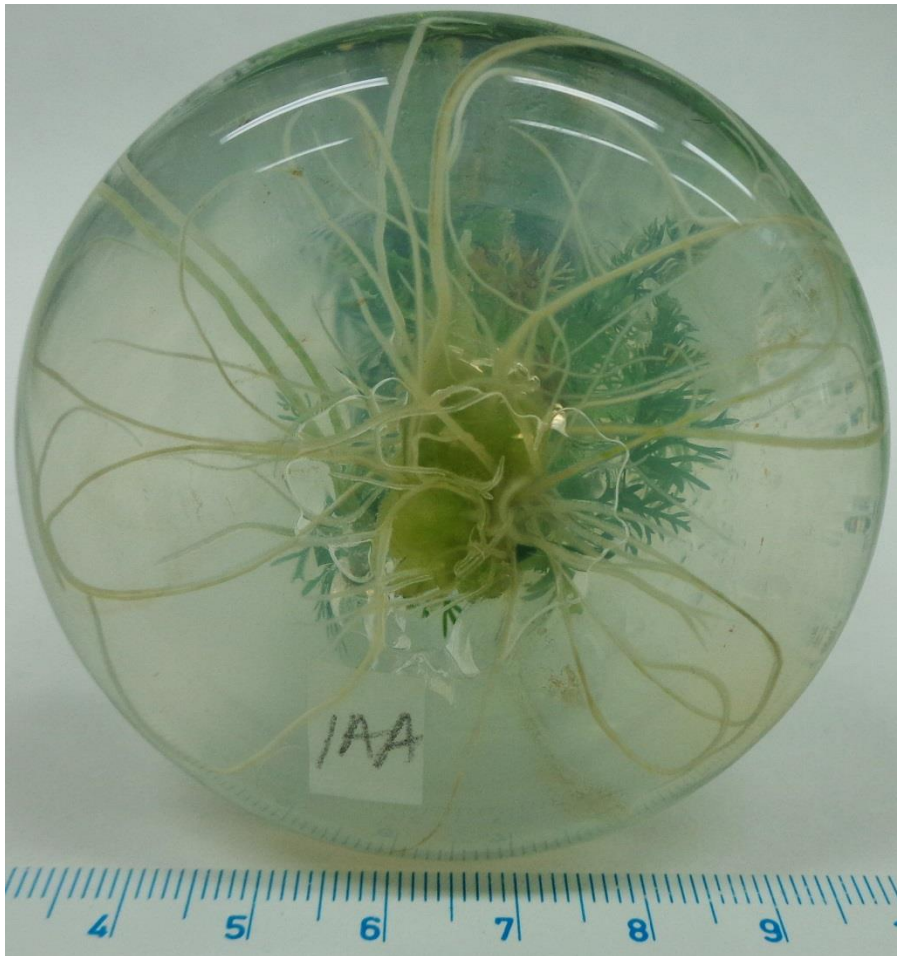
Obr. 15: Embrya *Angelica archangelica*, varianta JIZERKA, médium OK, foceno po 14 dnech kultivace



Obr. 16: Klíčící semena *Foeniculum vulgare*, varianta NG, médium OK, foceno po 12 dnech od vysazení



Obr. 17: Explantáty *Foeniculum vulgare*, varianta NG, vlevo na médiu IAA, vpravo na médiu IBA, foceno po 4 týdenní kultivaci



Obr. 18: Kořeny *Foeniculum vulgare*, varianta NG, médium IAA, foceno po 4 týdnech kultivace



Obr. 19: Délka kořenů *Foeniculum vulgare*, varianta NG, médiu IBA