

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta tropického zemědělství**

**Katedra tropických a subtropických plodin a agrolesnictví**



**Mikropropagace u rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.)**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí bakalářské práce:**

**doc. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani**

**Vypracoval:**

**Pavλίna Jaklová**

**Praha**

**2013**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Mikropropagace u rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.) vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém soupisu literatury. Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně ČZU v Praze a zpřístupněna ke studijním účelům.

**V Praze dne 3.5. 2013**

**Podpis .....**  
**Pavčina Jaklová**

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla ráda poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce panu doc. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani za odborné rady, pomoc a trpělivost při spolupráci. Rovněž děkuji za jeho vstřícný přístup během zpracování bakalářské práce a zlepšení mých znalostí v těchto tématech.

Také bych ráda poděkovala České zemědělské univerzitě v Praze, především Fakultě tropického zemědělství za podporu a ochotu, že mě nechala pracovat v laboratoři rostlinných explantátů a poskytla mi všechnen materiál potřebný k napsání mé bakalářské práce.

## Abstrakt

Rosnatka kapská (*Drosera capensis* L.) je velmi oblíbená masožravá rostlina, která je často pěstovaná jako okrasná rostlina. Generativně se rozmnožuje (semeny) a vegetativním způsobem se množí pomocí listových a kořenových řízků či dělením trsů a v *in vitro* kulturách.

Hlavním cílem bakalářské práce bylo sledovat vliv cytokininů (kinetinu a zeatinu) na regeneraci a růst rosnatky kapské kultivované na 1/2 MS a 1/4 MS živném médiu (Murashige a Skoog, 1962) v *in vitro* podmínkách.

Jako výchozí materiál se použily listové explantáty a byly kultivovány v celkem 14 variantách kultivačního média. Živná média 1/2 MS a 1/4 MS byla doplněna o kinetin a zeatin ve 3 koncentracích: 0,5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  a 5,0  $\mu\text{M}$ . Jako kontrolní média se zvolila 1/2 MS a 1/4 MS bez obsahu růstových regulátorů. Listové explantáty byly kultivovány po dobu 6 měsíců (doba subkultivace) v kultivačním boxu o svítivosti 3000 lx, s denní fotoperiodou 16/8 h den/noc, při teplotě 25°C / 20°C den/noc.

Z hlediska koeficientu mikropropagace nejvyšší počet nově vytvořených listů na jeden původní explantát se vytvořil na 1/2 MS kontrolním médiu bez růstových regulátorů a to  $19,3 \pm 4,3$ , dále na 1/2 MS s obsahem 0,5  $\mu\text{M}$  kinetinu, a to  $17,5 \pm 3,7$ . Ve variantách s obsahem zeatinu byl nejvyšší koeficient mikropropagace dosažen rovněž na 1/2 MS s obsahem 0,5  $\mu\text{M}$  zeatinu, a to  $15,5 \pm 5,3$ . Explantáty o optimální velikosti 0,5 cm lépe regenerovaly než explantáty o menší velikosti. Průměrně nejvíce biomasy vytvořily explantáty kultivované na 1/4 MS s přídavkem 2,5  $\mu\text{M}$  a to  $1,0291 \pm 1,41\text{g}$ .

Lze konstatovat, že bylo dosaženo lepších výsledků v kultivačních médiích s přídavkem kinetinu než zeatinu, a že vysoká koncentrace cytokininů inhibuje růst kořenů a zpomaluje růst u explantátů, a podporuje tvorbu kalusu. Dosažené výsledky v této studii se shodují s výsledky studií jiných autorů.

**Klíčová slova:** mikropropagace, *in vitro*, okrasné rostliny, *Droseraceae*, *Drosera capensis*, růstové regulátory, kinetin, zeatin

## Abstract

Cape Sundew (*Drosera capensis* L.) is a very popular carnivorous plant and it is mostly often known as a favourite ornamental plant. Generative reproduction using seeds and vegetative propagation using leaf or root cuttings or done by division of clumps and also by *in vitro* cultures.

The main aim of this thesis was to investigate the effect of cytokinins (kinetin and zeatin) on regeneration and growth on *D. capensis* cultivated on 1/2 MS and 1/4 MS (Murashige and Skoog, 1962) in *in vitro* conditions.

As primary plant materials were used leaf explants *D. capensis* cultivated in a total of 14 variants of the cultivation medium. Cultivation medium 1/2 MS and 1/4 MS were supplemented with kinetin and zeatin in 3 concentrations: 0.5  $\mu\text{M}$ ; 2.5  $\mu\text{M}$  and 5.0  $\mu\text{M}$ . As a control medium were chosen 1/2 MS and 1/4 MS without growth regulators. Leaf explants were cultivated for 6 months (time of subcultivation) in a cultivation box of light intensity 3000 lx, with daily photoperiod of 16/8 h day/night and temperature is 25 °C/20 °C day/night.

In terms of the coefficient of micropropagation, highest number of new leaves per explant was formed on 1/2 MS control mediums in the range  $19.3 \pm 4.3$ , followed by 1/2 MS containing kinetin with a concentration 0.5  $\mu\text{M}$  in the range  $17.5 \pm 3.7$ . In variants, which contained zeatin highest coefficient of micropropagation was achieved on 1/2 MS containing zeatin with a concentration 0.5  $\mu\text{M}$  in the range  $5.5 \pm 5.3$ . The explants of optimal size 0.5 cm regenerate better than explants of smaller size. The highest average weight of the biomass formed explants cultivated on 1/4 MS containing zeatin with a concentration of 2.5  $\mu\text{M}$  in the range  $1.0291 \pm 1.41$  g.

It can be concluded that better results were obtained on culture mediums supplemented with kinetin than with zeatin. Also higher concentration of cytokines inhibits growth of roots and also growth of explants, but initiated formation of callus. The results that were achieved in this study are consistent with results of other authors.

**Key words:** micropropagation, *in vitro*, ornamental plants, *Droseraceae*, *Drosera capensis*, growth regulator, kinetin, zeatin

# Obsah

---

<b>SEZNAM ZKRATEK:</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>2. LITERÁRNÍ REŠERŽE</b> .....	<b>- 3 -</b>
2.1. Historie rodu <i>Drosera</i> .....	- 3 -
2.2. Taxonomie rodu <i>Drosera</i> .....	- 3 -
2.3. Využití rodu <i>Drosera</i> .....	- 4 -
2.4. Rozšíření rodu <i>Drosera</i> .....	- 5 -
2.5. O rosnatce kapské ( <i>Drosera capensis</i> L.) .....	- 5 -
2.6. Botanický a morfologický popis <i>Drosera capensis</i> .....	- 6 -
2.6.1. Kořeny .....	- 7 -
2.6.2. Stonek .....	- 7 -
2.6.3. Listy .....	- 7 -
2.6.4. Květy a semena .....	- 9 -
2.7. Rozmnožování a pěstování .....	- 9 -
2.7.1. Generativní rozmnožování a pěstování.....	- 9 -
2.7.2. Vegetativní rozmnožování a pěstování .....	- 10 -
2.8. <i>In vitro</i> kultury okrasných rostlin .....	- 11 -
2.9. <i>In vitro</i> kultury rodu <i>Drosera</i> .....	- 12 -
<b>4. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>5. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>- 20 -</b>
5.1. Rostlinný materiál .....	- 20 -
5.2. Metodika .....	- 20 -
5.2.1. Mikropropagace .....	- 20 -
5.2.2. Hodnocení výsledků .....	- 22 -
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>- 23 -</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>- 35 -</b>

**Seznam zkratk:**

- 2,4-D (2,4 dichlorfenoxyoctvá kyselina)  
2,4-5-T (2,4-5-trichlorfenoxyoctová kyselina)  
B5 (Gamborg et al., 1968), kultivační médium  
BAP (benzylaminopurin)  
BA (benzyladenin)  
CA (aktivní uhlí)  
CPA (chlorfenoxyoctová kyselina).  
GA<sub>3</sub> (giberelinová kyselina)  
IAA (indolyloctová kyselin)  
IBA (indolylmáselná kyselina)  
KIN (kinetin)  
LS (Linsmaier a Skoog, 1965), kultivační médium  
MS (Murashige a Skoog, 1962)  
NAA (naftyloctová kyselina)  
RM (Reinert a Mohr, 1967), kultivační médium  
TDZ (thidiazuron)  
ZEA (zeatin)

# 1. Úvod

---

Do čeledi masožravých rostlin *Droseraceae* patří tři rody *Aldrovanda* (aldrovandka), *Dionaea* (mucholapka) a *Drosera* (rosnatka). Rod *Drosera*, je jedním z nejobsáhlejších rodů masožravých rostlin, náleží do něj okolo 194 druhů rostlin (Biteau, 2011). Rosnatky jsou globálně rozptýleny po celém světě (v ČR velmi vzácně jen 3 druhy), ale převážně rostou v subtropích jižní polokoule. Hlavními centry jejich diverzity je Austrálie a jižní Afrika (Sysová, 2012).

Rostlinní zástupci tohoto rodu jsou ceněny především pro svoji ornamentální hodnotu a léčivé vlastnosti. Rosnatky jsou okrasné přizemní růžicí stále zelených listů konvergovaných do lapacích pastí s tentakulemi zakončených hlavičkami s lepkavým slizem. Ve tkáních rostlin jsou obsaženy účinné léčivé látky, sekundární metabolity 1,4-naftochinony, zejména plumbagin a ramentaceon. Tyto látky mají významné antimikrobiální, antituberkulózní a fungicidní účinky (Ziaratnia et al., 2009)

Jeden z druhů rodu *Drosera* je rosnatka kapská (*Drosera capensis*, Linné 1756), která je endemitem původem z jižní Afriky a vyskytuje se v oblasti jihozápadního Kapska. Díky drobnému vzrůstu (7 až 15 cm), značné rozmanitosti kultivarů, poměrně snadnému pěstování a množení se stala jednou z nejčastěji pěstovaných okrasných masožravých rostlin (Sysová, 2012).

Rosnatka kapská se rozmnožuje generativně (semeny) a vegetativně (listovými a kořenovými řízků či dělením trsů). Tento druh rosnatky se také rozmnožuje pomocí kultivace rostlinných explantátů v *in vitro* podmínkách (mikropropagace) nám umožňují množit rostliny nezávisle na klimatických podmínkách během celého roku. Tato technika nám umožňuje regulovat podmínky kultivace (např. složení kultivačního média aj.) (Pavlová, 1992; Kováč, 1995).

Předložená bakalářská práce má za cíl sledovat vliv dvou cytokininů,“ kinetinu a zeatinu“, na regeneraci a tvorbu nadzemních částí u rosnatky kapské (*Drosera capensis*, L.) v *in vitro* podmínkách.



## **2. Literární rešerže**

---

### **2.1. Historie rodu *Drosera***

Rosnatky byly často popisované rostliny již ve starověku a středověku. Byly známé a používané jako léčivé byliny proti nachlazení, nikoliv jako masožravé rostliny. Pravděpodobně první podrobnější popis rosnatky je z roku 1554 a to v díle holandského botanika a lékaře Remberta Dodoense. Další záznam je z roku 1578 v herbáři anglického botanika Henry Lyte. Roku 1596 je uvedena zmínka v druhém českém vydání Matthiolova Herbáře o *Drosera anglica*.

O zařazení do botanické systematiky a pojmenování rodu se zasloužil Carl Linné v roce 1756. Rod pojmenoval *Drosera*, česky rosnatka, což převzal z řeckého slova *droseros*, což znamená orosený, podle kapiček lepivého slizu na listech, které mu připomínaly rosu. Německý botanik W. A. Roth jako první pozoroval pohyby tentakulí na listech rosnatek. V roce 1875 Charles Darwin vydal knihu *Insectivorous plants*, kde na základě jeho výzkumu s *Drosera rotundifolia* potvrdil masožravé schopnosti rosnatek (Zoun, 2006).

### **2.2. Taxonomie rodu *Drosera***

Do čeledi masožravých rostlin *Droseraceae* náleží tři rody *Aldrovanda* (aldrovandka), *Dionaea* (mucholapka) a *Drosera* (rosnatka). Rod *Drosera* je jeden z největších rodů masožravých rostlin, doposud bylo popsáno 194 druhů (Biteau, 2011), z nichž je mnoho druhů a poddruhů nově popsanych, tudíž dostaly jen dočasná jména, dosud nepublikovaná v botanické nomenklatuře (Studnička, 2007; Sysová, 2012). Zástupci rodu *Drosera* jsou dle systematické botaniky dále členěni na základě příbuznosti, fylogenetických a morfologických souvislostí na tři podrody, které se dále rozdělují na dvanáct sekcí. Užitečné a přehledné je rozdělení rodu *Drosera* do pěti ekologických skupin na základě životních forem, nároků na životní prostředí a pěstování (Studnička, 1984). Vlivem nových poznatků z cytologie a cytochemie nejsou systematičtí botanici jednotní v názorech na taxonomii rodu.

### 2.3. Využití rodu *Drosera*

Rod *Drosera* má velký potenciál pro farmaceutické využití. Listy a kořeny rosnatek obsahují bioaktivní sloučeniny, jako jsou flavonoidy (kemferol, fisetin, myricetin, kvercetin a rhamnetin), chinony (plumbagin, hydroplumbagin, ramentaceon, rossolisid), karotenoidy, pryskyřice, taniny a rostlinné kyseliny (kyselina máselná, kyselina citronová, kyselina mravenčí, kyselina gallová, kyselina jablečná, kyselina propionová a kyselina askorbová). Rosnatky jsou léčivé byliny, běžně používané v tradiční medicíně k léčbě astmatu, kašle, infekce plic a žaludečních vředů (Biteau et al., 2011).

Rosnatky mají schopnost vylučovat bílkoviny na vnějších částech jejich listů. Této vlastnosti může být využito pro nový heterologní expresní systém, který je schopný produkovat rekombinované proteiny. Rekombinované proteiny u transgenních rostlin mohou být tak sbírány přímo z povrchu rostlinné tkáně, z jejich sekretu na povrchu listů. Izolace kvalitní DNA je základním předpokladem pro molekulárně biologické studie volně žijících nebo geneticky upravených rostlin z rodu *Drosera* (Biteau et al., 2011).

*Drosera capensis* je nejběžněji pěstovaná a prodávaná rosnatka zejména pro svoji velikost, pro relativně jednoduché, na podmínky nenáročné pěstování, snadné vegetativní množení pomocí řízků z listů a kořenů a pro produkci velkého množství semen.

*Drosera regia* vylučuje největší množství lepkavého slizu díky svým velkým a lineárním listům, které jsou dlouhé až 70 cm (Biteau et al., 2011).

Všechny druhy rodu *Drosera* obsahují dva typy chinonů - plumbagin (2-metyl-5-hydroxy-1,4-naftochinon) nebo ramentaceon [7-methyljuglon (5-hydroxy-7-metyl-1,4-naftochinon)], rostlinné tkáně je osahují oba současně nebo samostatně. Plumbagin vykazuje celou řadu biologicky aktivních vlastností. Má antimikrobiální, protikřečové a protirakovinné účinky. Z nemocí je účinný proti tuberkulóze, černému kašli, astmatu, leprě, malárii, pomáhá při bronchiální infekci a hyperglykémii. Zvyšuje *in vitro* fagocytózu lidských granulocytů, je inhibitor chitinsyntetázy a imunomodulátor. Plumbagin může najít využití v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu nebo se také uplatní jako afrodiziakum (Prasad a Jayaram, 2005).

*Drosera indica*, *D. burmanii* a *D. peltata* jsou používány v tradiční ayurvédské medicíně (Prasad a Jayaram, 2005). *D. indica* a *D. burmanii* nacházejí také uplatnění v tradiční thajské medicíně. Tyto rosnatky se užívají jako bylinný prostředek na léčbu malárie, kožních onemocnění a úplavice (Putalun et al., 2010).

Všechny druhy rosnatek, jsou jako masožravé rostliny, součástí četných botanických sbírek profesionálních a zájmových pěstitelů.

## 2.4. Rozšíření rodu *Drosera*

Rosnatky mají široký areál svého rozšíření. Najdeme je jak na Starém a Novém kontinentě, tak v Austrálii i Africe. Převážné množství druhů se vyskytuje na jižní polokouli. Pravděpodobně se již vyskytovaly na pravěkém jižním superkontinentu Gondwaně a po rozdělení kontinentů vznikaly recentní druhy rosnatek. Na severní polokouli se vyskytuje menší množství druhů. Úplnou výjimku tvoří Antarktida, kde se nenalézá žádný žijící druh (Studnička, 2006). Většina druhů rosnatek jsou endemitické masožravé rostliny malých území. Jelikož se vyskytují v různých biotopech nebo v geograficky izolovaných lokalitách a v oblastech s různými životními podmínkami, vytvořily se různé druhy, které se adaptovaly na dané podmínky, proto se jednotlivé druhy rosnatek od sebe liší morfologickým uspořádáním a způsobem života (Studnička, 1984). Nejvíce druhů je zastoupeno v subtropické Austrálii, kterou lze považovat za první hlavní centrum rozšíření rosnatek. Vyskytuje se zde okolo 70 druhů (Sysová, 2012). Rostou zde na dlouhodobě vyprahlých písčitých půdách a to jak v severní části Austrálie s letními dešti, tak v jižní části se zimními dešti (Studnička, 2006). Druhé velké centrum rozšíření rosnatek je v jižní Africe, vyskytuje se zde okolo 30 druhů. Rostou tu svébytné endemitické druhy v tropických savanách v okolí Mysu Dobré Naděje a Stolové Hory. V tropické Jižní Americe se rosnatky vyskytují v horských polohách. Obecně se vyskytují ve vlhkých a stále teplých oblastech. Na severní polokouli rostou v rašeliništích a mokřinách mírného pásma, prameništích, horských vrcholech a vyskytují se i v tundrách za polárním kruhem (Zoun, 2006).

## 2.5. O rosnatce kapské (*Drosera capensis* L.)

Rosnatka kapská (*Drosera capensis* L.) je běžně pěstovaná, pěstiteli velmi oblíbená masožravá rostlina (viz. Obraz č. 1 A a B), která náleží do čeledi *Droseraceae*. Jak už její druhové jméno napovídá, pochází z jižní Afriky, z jihozápadního Kapska, z okolí Kapského města (Zoun, 2006). *Drosera capensis* je často pěstována jako okrasná rostlina, velké oblíbenosti dosáhla u pěstitelů kvůli své růžici stálezelených listům s lepíciými pastmi, značné rozmanitosti forem a nevelkými nároky na pěstování. V České Republice je běžně k dostání v zahradnickém sortimentu (Sysová, 2012).

Vytváří vegetační formaci zvanou fynbos, která je květnatá a má keřové patro ze sklerofylních keřů jako například: *Erica spec. Div.*, *Leucadendron salignum* a jiné (Studnička et. Al., 2010). Tato rosnatka roste na půdách s vysokou půdní vlhkostí. Typické

typy půd, na kterých se tato rosnatka vyskytuje, jsou: kyselé, chudé a písčité, bažinaté, rašelinné a slatinné (Pásek, 2006). Populace *D. capensis* se vyskytují mezi travními porosty, na vlhkých skalách pokrytých mechem, na zarostlých náplavách a březích vodních toků (Lecoufle, 1993). Na těchto zamokřených místech je křovité patro rozvolněné a ustupuje slatinnému rostlinstvu, kterému dominují traviny z čeledi *Restionaceae* (Studnička et. Al., 2010). Rosnatka osidluje také vlhčí expozice hor, kde využívá vláh z četných mlh. Druh dobře snáší plné osvětlení sluncem. Vyhovuje mu subhumidní až humidní i mírné klima. *D. capensis* snese rozmezí teplot teploty od 2°C do 40°C (Lecoufle, 1993). V zimě, kdy je nedostatek světla, tato rosnatka snese pokles teploty až k 0°C, při teplotě -5°C odumírá nadzemní část rostliny, na jaře většinou obrazí z kořenů (Zoun, 2006). Období sucha či požárů je rostlina schopna přežít pomocí spících pupenů nebo zásobních kořenů (Sysová, 2012). *D. capensis* se dobře daří i ve vnitřních podmínkách, lze snadno ji pěstovat ve skleníku, teráriu, zimních zahradách nebo v květináči za oknem (Zoun, 2006). V našich středoevropských podmínkách aktivně roste během dlouhého dne, v období od jara do podzimu. Expozice jí vyhovuje jižní, jihovýchodní, západní a jihozápadní (Pásek, 2006).

## **2.6. Botanický a morfologický popis *Drosera capensis***

*Drosera capensis* je vytrvalá bylina (Bruzzese et al., 2010) a plně vzrostlá rostlina měří 7-15 cm (Lecoufle, 1993). Nejčastěji se pěstují tyto tři kultivary: „Albino“ (bílé květy, bez červeného barviva v listech – bílé tentakule), „Narrow Leaf“ (zkrácená lodyha, úzké listy), „Giant“ (jalové květy, čepel zhruba 10 cm na 10 cm dlouhém řapíku), „All Red“ (rudě naběhlé listy, červené květy). Přírodní typ má široké listy, červené až hnědé tentakule a prodlouženou lodyhu (Studnička, 2006). *D. capensis* patří do ekologické skupiny tzv. nezatahujících světlomilných rosnatek, což znamená, že nadzemní orgány rostliny se nikdy během roku nezatahují pod povrch země a rostlina není nucena vytvořit přezimující orgány. Podnebí proto musí být mírné a teplotně vyrovnané během celého roku, aby umožnilo přežití nadzemních orgánů. Typické klima je pro ně tropické a subtropické. V chladnějším období se růst rostliny pozastaví. Rosnatky z této ekologické skupiny mají rády dostatek světla, mírně zastíněné podmínky, ale nesnáší úplný zástin jiných rostlin. Vyskytují se na vlhkých stanovištích se stále vysokou půdní vlhkostí, úplné vyschnutí substrátu má pro ně fatální následky, další generace se poté vyvíjí ze semen. Tato skupina zahrnuje běžně pěstované rosnatky: *D. aliciae*, *D. spathulata*, *D. capillaris*, *D. indica*, *D. bervillei*, *D. pustula*, *D. regia*, *D. arcturi*, *D. stenopetala* (Studnička, 1984).

*D. capensis* rovněž náleží do skupiny tzv. afrických kaulescentních rosnatek z horských oblastí jižní Afriky, které mají výrazný stonek a listy na něm vyrůstají ve spirále jeden za druhým (Švarc, 2003).

### **2.6.1. Kořeny**

Kořenový systém mají většinou slabě vyvinutý, primární kořeny brzy odumírají a jsou nahrazeny adventivními ochlupenými kořeny (Sysová, 2012). U starších rostlin z kmínku vyrůstají silné vláknité až drátovité, málo větvené kořeny (viz. Obraz č. 4), které kmínek zpevňují a rostlinu kotví v zemi (Zoun, 2006). Kořeny lze použít k vegetativnímu množení, používají se kořenové řízků velké 1,5 – 2 cm, nový identičtí jedinci vyrůstají z adventivních pupenů na kořenech (Cheers, 1992).

### **2.6.2. Stonek**

Rosnatky tvoří několika centimetrový kmínek, ze kterého vyrůstá spirálovitě růžice listů (Studnička, 1984). Lodyha je přímá až vystoupavá (Zoun, 2006). Starší rostliny vytváří delší lodyhu (Lecoufle, 1993). Někdy se u starších rostlin vytvoří delší tmavý kmínek, na vrcholu olistněný, což může evokovat dojem „miniaturní palmy“ (viz. Obraz č. 2 a 3) (Cheers, 1992).

### **2.6.3. Listy**

*Drosera capensis* používá své lepkavé listy jako adhezní past (Studnička, 2006). Kombinuje pasivní způsob lovu - láká kořist třpytem, červenavou barvou, pachem listů a aktivní způsob lovu - obaluje a posouvá přilepenou kořist listem (viz. Obraz č. 1 C a D). Pohyb listů trvá několik desítek minut až několik hodin. Rostlina se tak snaží obalit kořist co největší plochou listu, aby ji co nejúčinněji rozložila a strávila (Zoun, 2006). Pohyb listu je pomalý, ale docela viditelný, přesněji trvá mezi 6 – 14 hodinami (Lecoufle, 1993). Na rychlost pohybu má vliv stáří, opotřebením a vitalita listu. Dalším faktorem ovlivňující pohyb listu je teplota a sluneční světlo – když je chladno, pohyb je pomalejší, se stoupající teplotou a osluněním se rychlost pohybu zvyšuje (Studnička, 2006). Listy vyrůstají na bázi lodyhy. Jsou úzké, ploché, mají protažený tvar listové čepele a jejich konce jsou zaoblené (Cheers, 1992). Řapík listu může být dlouhý až 4 cm, list až 10 cm dlouhý a 4-6 mm široký (Lecoufle, 1993). Na konci listů jsou pohyblivé stopkaté žlázy, které se ohýbají,

když jsou podrážděné kořisti. Tyto žlázy se nazývají tentakule, jsou to emergence, pohyblivé žláznaté stopkaté výrůstky, které vznikají z buněk pokožky a z podpokožkových buněk (Studnička, 2006). Tentakule mohou být vlivem barviva droserinu zbarveny do červena (Studnička et. Al., 2010). Hlavičky tentakulí produkují lepkavý, vysoce smáčivý sliz na přilákání a polapení kořisti (viz. Obraz č. 1 D). Sliz obsahuje malé množství trávicích enzymů rostlinného původu. V tekutině jsou obsaženy proteázy - endopeptidázy, esterázy - karboxylesterhydrolázy, fosfatázy - fosfomonoesterázy a peroxidázy (Studnička, 2006). Sliz obsahuje mukopolysacharidy, které jsou také součástí výměšků trávicí soustavy u živočichů (Studnička, 1984). Tentakule se u *Drosera spp.* se rozlišují podle morfologie na krátké - diskální tentakule na ploše čepele, dlouhé tentakule -marginální na okraji čepele a interzonální, které vyrůstají hned za marginálními a někdy je překonají svoji délkou. Tyto tři druhy tentakulí se hlavně liší svojí funkcí. Když se kořist přilepí na tentakule, jsou mechanicky podrážděny a vyvolaný elektrický vzruch se šíří k okolním žlázám. Marginální tentakule, podrážděné buď přímo či zprostředkovaně, se sklánějí vždy ve stejném směru k středové ose listu, bez ohledu na druh a směr dráždění. Slouží především k zafixování kořisti a jejímu posunutí do nejvýhodnější polohy tak, aby ji žlázy mohly obalit co největší plochou. Pohyb, který vykonávají marginální tentakule se nazývá nastie. Interzonální tentakule slouží k rozpoznání, zda je kořist stravitelná, sklánějí se ke kořisti a zvyšují vylučování trávicí tekutiny, čím více jsou mechanicky drážděny pohybem kořisti. Spolu s marginálními tentakulemi jsou jako první přímo vystaveny mechanickému dráždění. Polapené kořisti sekret, vylučovaný rostlinou, zalepí vzduchové otvory a v důsledku toho se udusí. Trávicí enzymy proteázy začnou rozkládat nízkomolekulární bílkoviny skeletu kořisti na aminokyseliny a krátké peptidy, které jsou rozpustné ve vodě. Tyto trávicí produkty způsobí chemické podráždění dalších žláz (tentakulí). Na toto chemické podráždění reagují i diskální tentakule a přiklánějí se ke kořisti, ve směru odkud se šíří vzruch, v tomto momentě je v listu měřitelné elektrické napětí. Tento druh pohybu, který vykonávají diskální tentakule se nazývá tropismus. U *D. capensis* dochází rovněž k růstovému pohybu čepele. Celý list postupně během několika hodin ovine kořist. Po strávení kořisti se list se narovná do původní polohy, opět růstovým pohybem, vlivem fytohormonu auxinu. Na listu zůstávají nestravitelné chitinové části kořisti (Studnička, 2006).

#### 2.6.4. Květy a semena

*Drosera capensis* je velice ozdobná svým květem. Tvoří asi 30 cm vysoké květenství typu vijan s 20 až 30 narůžovělými, kleistogamickými květy (viz. Obraz č. 1 E), velkými asi 15 mm až 1,5 cm, které postupně rozkvétají od báze květenství (Zoun, 2006; Studnička, 1984). Rostliny vykvétají na jaře (Cheers, 1992). Po odkvětu lodyha zůstává vzpřímená a na jejím konci se tvoří tobolky, které obsahují semena (Lecoufle, 1993).

#### 2.7. Rozmnožování a pěstování

Množení se provádí výsevem semen nebo listovými a kořenovými řízků či dělením trsů.

##### 2.7.1. Generativní rozmnožování a pěstování

Pohlavní rozmnožování probíhá na jaře, *D. capensis* je samosprašná, kdy ze semen (viz. Obraz č. 1 F), která vypadnou na zem a vyklíčí malé rostlinky (Lecoufle, 1993). Velmi malá semena nemají dostatek stavebních látek, aby vytvořily plnohodnotné lapací orgány, proto nejdříve vznikne anatomicky jednoduchý (dva lístky, lodyžka, kořenové vlášení) fotosynteticky aktivní prokaulom. Ten asimilací vytvoří dostatek stavebních látek. Po čase na vrcholu prokaulomu vznikne mladá rosnatka, která se tvarově liší od dospělých rostlin. Později mladé rostlině vyrostou kořeny, který ji ukotví v půdě a prokaulom zanikne (Studnička, 1984).

Semena též můžeme usušit a uchovat je přes zimu venku či v chladničce při teplotě 5 až 7 °C. (Studnička, 1984). Na jaře se vysejí do nádob na povrch (nezasypávají se) rašelinového substrátu smíchaného s pískem v poměru 2:1, který je nutno udržovat stále vlhký, pH substrátu by mělo být 5 – 5,5 a teplota 15-30°C. K udržení vlhkosti seřového lůžka může pomoci zakrytí nádoby deskou ze skla či plastu (Studnička, 1984). Rosnatkám prospívá kolísavá vzdušná vlhkost (50-90%) a dobré větrání (Pásek, 2006). Umožňuje-li to počasí, postaví se nádoba na čerstvý vzduch (dobře větrané místo) a přímé sluneční světlo. Semena rosnatek klíčí většinou za 3 až 6 týdnů od výsevu (Studnička, 1984). Místo rašeliny lze použít rozmělněný, prosetý a horkou parou sterilizovaný rašeliník nebo mechovou rašelinu smíchanou s různým křemičitým pískem v poměru 2-3:1 či různé kombinace rašeliny, perlitu, vermikulitu, dřevěného uhlí, kokosové drti nebo molitanu. Dno nádoby se vysype drenáží z hrubšího šterku vysokou 2-3 cm (Pásek, 2006). Když semena vyklíčí v mladé semenáčky (prokaulom již zanikl), přendají se na čerstvý

rašelinný substrát a vyjednotí se. Přepíchávají se jednotlivě nebo po skupinkách. Jednocení se provádí pomocí navlhčené tyčinky, což nám usnadní manipulaci s rostlinou (Lecoufle, 1993). Dostatečně zaléváme vodou zespoda tzv. podmokem nejlépe měkkou vodou. Substrát by neměl nikdy úplně vyschnout a na zimu by se měla zálivka omezit. Doporučuje se použít preventivní postřik fungicidem. V nevhodných podmínkách, teplotách, při nedostatku světla, vysoké vlhkosti vzduchu a substrátu jsou rostliny náchylné na houbové choroby (Pásek, 2006). Plného vzrůstu dosáhne rostlina po třech letech (Lecoufle, 1993). Do třech let věku se rostliny každoročně přesazují, nejlépe na jaře (Zoun, 2006). Rostlinu lze zmladit odstraněním starých listů tak, že je odtrhneme od kmínku a rostliny, které mají kmínek, se zasadí hlouběji do substrátu (Pásek, 2006).

Saví a žraví škůdci, (nejčastěji mšice) jsou příčinou úhynu rosnatek. Mladé rostliny a semenáčky vyvírají larvy smutnic, které žijí v substrátu. Účinnou ochranou proti těmto škůdcům jsou postřiky, ale rosnatky jsou na pesticidy citlivé, proto je dobré roztok nejprve odzkoušet. Během zimy kdy je nedostatek světla, popřípadě když je nevhodná teplota (nízká) kombinovaná s vysokou vzdušnou vlhkostí nebo u stresovaných, nevhodně pěstovaných (v uzavřených prostorách) rosnatek jsou častým problémem houbové choroby a hniloby kořenů a stonků. Stav napadených rostlin lze zlepšit okamžitou změnou podmínek a použít preventivní postřik systémovými fungicidy (Pásek, 2006).

### **2.7.2. Vegetativní rozmnožování a pěstování**

Vegetativní množení je často používaný způsob množení, kdy z části kteréhokoliv rostlinného vegetativního orgánu regenerací buněk vznikne nová mladá rostlina, identická s mateřskou rostlinou. Nejčastěji se užívá řízků z listů nebo kořenů. Rosnatky tvoří na starých listech a kořenech samovolně nové odnože (Pásek, 2006).

Jelikož má *D. capensis* silné, drátovité kořeny, lze k množení použít 2 - 4 cm velké kořenové řízky (viz. Obraz č. 1 B). Řízky se položí na vlhkou rašelinu, kde založí adventivní pupeny a vytvoří mladé rostliny (Studnička, 1984).

Na jaře a v létě je možné rosnatky množit listovými řízkami. Dobře vyžralý list se celý oddělí od kmínku a položí se spodní plochou listu na vlhkou rašelinu (Studnička, 1984). Listový řízek by měl mít délku okolo 4 cm (Sysová, 2012). Svrchu list přikryjeme ostříhanými špičkami živého rašeliníku a udržujeme vysokou vzdušnou vlhkost (Studnička, 1984). Listové řízky by měli být umístěny na dobře osvětlené místo, nikoliv na přímé sluneční světlo a obraží během několika týdnů (Sysová, 2012).



## 2.8. *In vitro* kultury okrasných rostlin

Techniky *in vitro* mikropropagace zahrnují rychlé vegetativní množení cenného rostlinného materiálu pro zemědělství, lesnictví a je především široce komerčně využívaná k mikropropagaci okrasných rostlin (*Orchidaceae*, *Rosaceae*) ve velkém měřítku (Chugh, 2009).

Například rostliny z čeledi *Orchidaceae*, které jsou zejména známé jako okrasné rostliny, některé druhy se také užívají jako bylinné léky či potravina (hlízy *Cynorchis* a *Eulophia*) (Arditti, 1992 cit. Chugh et al., 2009). Některé rody *Anoectochilus*, *Goodyera*, *Ludisia* a *Macodes* se řadí do skupiny takzvaných orchidejí-drahokamů, které jsou okrasné svým listem. Rod *Vanilla* je zase příkladem orchideje používané jako koření. Zároveň mnoho druhům jako jsou *Rhynchostylis* a *Paphiopedilum* hrozí vyhynutí díky nevybíravému sběru a odlesňování pralesů. *In vitro* kultury čeledi *Orchidaceae* se zakládají ze vzrostných vrcholů, listových segmentů, axilárních pupenů, květních pupenů, rhizomových segmentů a kořenů. Moderní propagace a výrobní technologie i zapojení komerčních světových laboratoří tkáňových kultur do mikropropagace orchidejí, zdůrazňují, jak se staly orchideje populárními v květinářském průmyslu (Chugh et al., 2009).

Také rostliny z čeledi *Rosaceae* jsou jedny z nejznámějších okrasných rostlin. *In vitro* mikropropagace zde hraje významnou roli v rychlém množení elitních klonů, kultivarů s požadovanými morfologickými rysy a pro produkci zdravých rostlin bez patogenů. Techniky mikropropagace jsou založeny na organogenezy nebo somatické embryogenezy. K založení *in vitro* kultury se nejčastěji užívá apikálních pupenů a nodálních stonkových segmentů. Nejpoužívanějšími růstovými regulátory jsou cytokininy BAP a TDZ, v některých případech se používají nízké koncentrace auxinů IBA, IAA, NAA (Pati et al., 2006).

Rovněž *Lavandula spp.* z čeledi *Lamiaceae* jsou okrasné aromatické rostliny s léčivými vlastnostmi, které jsou široce využívány v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém a květinářském průmyslu. Taková produkce rostlin ve velkém měřítku také vyžaduje účinné techniky množení *in vitro*. Techniky mikropropagace *Lavandula spp.* jsou založeny na meristémové proliferaci a organogenezi. Při mikropropagaci s využitím meristémové proliferace se kultura *in vitro* zakládá z 3 typů explantátů: tkáňových kultur, vzrostných vrcholů nebo nodálních segmentů (z jednoho nebo více nodů). Nodální segmenty z jednoho nodu jsou nejběžněji užívaným typem explantátů u *Lavandula spp.* Některé druhy (*L. latifolia*, *L. stoechas*, *Lavandula viridis* a *L. vera*) jsou kultivovány nejčastěji

na MS médiu bez růstových regulátorů nebo je doplněné o různé koncentrace BA nebo v kombinaci s auxiny IAA, IBA a NAA (Goncalves a Romano, 2012).

Rostliny z rodu *Dracaena* z čeledi *Agavaceae* jsou velmi dobře známé jako pokojové okrasné rostliny, například *Dracaena sanderiana*, známá jako „Lucky Bamboo“. Některé druhy (*Dracaena mannini*, *Dracaena arborea*, *Dracaena draco*) mají i léčivé účinky a užívají se k léčbě řadě nemocí. K založení *in vitro* kultury se užívá nodálních segmentů, internodálních stonkových segmentů, listů, axilárních pupenů a kořenů. Explantáty se kultivují na MS médiu obsahující různé typy a koncentrace auxinů 2,4-D; 2,4-5-T, CPA (Aslam, Mujib a Prasad Sharma, 2012).

Další ceněnou okrasnou rostlinou je *Lychnis senno* z čeledi *Caryophyllaceae*. Množení pomocí semen není vhodné z důvodu jejich nízké klíčivosti. Proto je zapotřebí optimalizovat metody pro *in vitro* klíčení a množení tohoto druhu. Aby semena klíčila, ošetří se GA<sub>3</sub> a kultivují se na 1/2 MS. Takto vyrostlé semenáčky *in vitro* byly využity pro následné pokusy. Jako explantáty se použily vzrostlé vrcholy ze semenáčků a kultivovaly se na MS médiu s obsahem BA a NAA. Z regenerovaných rostlin se použily axilární pupeny a nodální segmenty jako explantáty pro další subkultivaci na MS médiu obsahující různé koncentrace růstových regulátorů BA a NAA. Získané výhonky se dále kultivovaly na 1/2 MS doplněné o různé koncentrace NAA, aby se podpořila tvorba kořenů. Sazeničky dobře rostly a po přesazení do *ex vitro* podmínek do skleníku vykvetly (Chan et al., 2006).

## **2.9. *In vitro* kultury rodu *Drosera***

Díky zemědělskému rozvoji, mizí populace rosnatek ze svých přirozených stanovišť. Také využití v bylinkářství a ornamentální hodnota těchto druhů vedla k jejich sběru. Rod *Drosera* je přírodním zdrojem farmakologicky významných látek (např. naftochinony, flavonoidy, antokyany, fenolové sloučeniny) a mohou být použity jako substráty při výrobě léčiv.

Čeď *Droseraceae* je tak stále vzácnější (všechny druhy rostoucí v Evropě jsou v současné době zařazeny na Červeném seznamu ohrožených rostlin) proto využití přirozeně rostoucích rostlin jako zdroj biologicky aktivních látek již není možné (Marczak et al., 2005). Farmaceutické využití, alternativní zdroj rostlinného materiálu a zachování rodu *Drosera* jsou hlavní důvody pro množení a optimalizaci metod *in vitro*. Využití *in vitro* vypěstovaných rostlin z rodu *Drosera* může být životaschopnou alternativou strategie pro výrobu plumbaginu a dalších cenných fytochemikálií (Prasad a Jayaram,

2005). Navíc, použití biotických a abiotických elicitorů zvyšuje syntézu farmakologicky využitelných účinných látek (Banasiuk et al., 2012).

Rosnatky mají velkou schopnost regenerace a jsou proto úspěšně pěstovány *in vitro* podmínkách. Ke kultivaci mohou být použity různé rostlinné části. Semena byla použita pro množení *in vitro* u druhu *Drosera intermedia* (Grevestuk et al., 2010), *D. peltata* (Kim a Jang, 2003), *D. anglica* a *D. cuneifolia* (Kawiak et al., 2003), listy u *D. aliciae* (Kawiak et al., 2011), *D. rotundifolia*, *D. binata* a *D. capensis* (Anthony, 1992), vrcholové pupeny u *D. spatulata* (Perica a Berljak, 1996), *D. peltata* (Kim a Jang, 2003), *D. indica* (Jarayam a Prasad, 2007), axilární pupeny a internodia u *D. rotundifolia* and *D. intermedia* (van Waes, 1985 cit. Jarayam and Prasad, 2007), poupata a květní stopky u *D. natalensis* (Crouch a van Staden 1988 cit. Jarayam a Prasad, 2007), rhizomy u *D. binata* (Kawiak et al. 2003) a *D. natalensis* (Crouch and van Staden 1988 cit. Jarayam a Prasad, 2007) a kalusové kultury u *D. spatulata* (Bobák et al., 1995).

Když je kultura *in vitro* založena ze semen, může být problém s dormancí, která se dá překonat ošetřením chladem (4°C) nebo přidáním giberelinové kyseliny v různých ppm (Jayaram a Prasad, 2005; Jayaram a Prasad; 2007, Sysová, 2012). Klíčivost semen *D. peltata*, která byla uložena v chladu při teplotě 4 °C po dobu nejméně 4 týdnů, byla mnohem vyšší než u semen, která nebyla ošetřena chladem (Kim a Jang, 2003).

Rostliny rodu *Drosera* jsou schopny spontánně vykvést v *in vitro* podmínkách. Pomocí růstových regulátorů lze kontrolovat čas kvetení, nezávisle na ročních obdobích, což má přínos pro další zkoumání souvisejícími s fyziologickými a biochemickými vlastnostmi rosnatek (Perica a Berljak, 1996). Kvetení je indukováno stimulací endogenními cytokininy (Singh et al. 2000 cit. Jarayam and Prasad, 2007). U *D. indica* bylo pozorováno kvetení *in vitro* bez přidání cytokininů, nicméně květy nepřinesly semena, jelikož je tento druh je více závislý na opylení hmyzem či větrem, než na samoopylení (Jarayam a Prasad, 2007). Kvetení bylo také pozorováno u *D. rotundifolia*, *D. capensis* na 1/2 MS médiu bez obsahu růstových regulátorů. *Drosera binata* vykvetla na 1/2 MS médium obsahující růstové regulátory BA a NAA (Anthony, 1992). U *D. spatulata* se květy objevily na 1/4 MS médiu obsahující BA a NAA (Perica a Berljak, 1996).

Například výhonky *D. indica* a *D. burmanii* byly kultivovány na základním MS médiu s různými koncentracemi cytokininů. Rostliny dobře regenerovaly výhony na MS médiu doplněné o nižších koncentracích růstových regulátorů KIN, ZEA a BAP. Oba druhy při vyšších koncentracích cytokininů zpomalily svůj růst. Po převodu explantátů zpět na MS médium bez obsahu růstových regulátorů nebo s nižšími

koncentracemi cytokininů, znovu obnovily rychlost svého růstu. Rostliny úspěšně zakořenily na základním MS médiu bez obsahu růstových regulátorů. (Jayaram a Prasad, 2005).

U explantátové kultury jiného druhu *D. rotundifolia* založené z listů kultivované v *in vitro* podmínkách bylo MS médiu doplněné o různé koncentrace růstových regulátorů BA a NAA. Nejlépe regenerovaly explantáty, které byly na médiu s nejnižšími koncentracemi růstových regulátorů. Největší proliferace nových výhonů byla pozorována u explantátů na médiu bez růstových regulátorů. Po 38 dnech od založení explantátové kultury se na mladých výhoncích objevilo po 3 až 7 lístcích na matečním explantátu, které spontánně začaly vytvářet kořeny. Po převodu na čerstvé MS médium bez přidání růstových regulátorů, rostliny rozkvetly a produkovaly fertlní semena (Bobák et al., 1995).

V případě mikropropagace třech druhů *D. anglica*, *D. binata* a *D. cuneifolia* sloužily k založení explantátové kultury listové segmenty a vzrostné vrcholy. Byly použity různé typy médií (kapalná a pevná) a různé koncentrace růstových regulátorů BA a NAA. U *D. binata* poskytlo nejvyšší počet regenerujících rostlin médium Vacin a Went (Vacin a Went, 1949) bez přidaných růstových regulátorů. U *D. Anglica* byla nejvyšší proliferace výhonků na médiu Fast (Fast, 1981) doplněné o nízké koncentrace růstových regulátorů BA a NAA. Zatímco *D. cunefolia* optimálně regenerovala na 1/2 MS médiu též s nižším obsahem růstových regulátorů BA a NAA. Kapalná média výrazně zvýšila regenerační potenciál u *D. anglica* a *D. binata* (Kawiak et al., 2003).

U jiného druhu rosnatek *D. aliciae* byla regenerace listových explantátů na 1/2 MS médiu velmi malá. Po přidání růstového regulátoru BA se zvýšila šance na přežití a rovněž se zvýšil koeficient mikropropagace explantátů (Kawiak et al., 2011).

Jako nejlepší médium pro množení a regeneraci rostlin *D. spatulata* bylo zvoleno MS médium. K *in vitro* mikropropagaci byly použity vzrostné vrcholy, které se kultivovaly na 1/2 MS médiu bez růstových regulátorů. Během třech měsíců se z jednoho explantátu zregerovalo na 100 až 200 rostlin. Kvetení bylo indukováno přidáním cytokininů. Rostliny vykvetly na následujících médiích: 1/4 MS s IBA a BA, 1/4 MS s IAA a BA, 1/4 MS IAA a KIN. Po přidání samotného NAA nebo v kombinaci s jiným růstovým regulátorem, regenerované výhonky více tvořily extrémně silné a husté kořeny. Oproti tomu na MS médiu bez růstových regulátorů se dříve tvořily adventivní pupeny před rozvojem růstu kořenů (Perica a Berljak, 1996).

V jiné studii byly použity listové explantáty třech druhů rosnatek *D. rotundifolia*, *D. binata* a *D. capensis*, které se kultivovaly na MS médiu. Jelikož rosnatky rostou na minerálně chudých půdách, byly zvoleny 1, 1/2, 1/4, 1/8 koncentrace solí a vitamínů

v MS médiu. Explantáty byly pěstovány na médiu bez růstových regulátorů a na médiu obsahující BA a NAA. Po 4 týdnech byly viditelné první výhonky. Nejlépe rostliny regenerovaly na 1/2 a 1/4 MS bez růstových regulátorů, ale na 1/2 MS se tvořilo více výhonků. Kolem 60 % explantátů tvořilo výhonky na 1/8 MS a 38% explantátů na základním MS médiu. Všechny druhy rosnatek po 6-8 týdnech začaly tvořit kořeny. Pouze 10% výhonků *D. binata* zakořenilo na médiu bez růstových regulátorů a 30% výhonků zakořenilo na 1/2 MS médiu obsahující BA a NAA. Asi jedna polovina explantátových kultur *D. rotundifolia* a *D. capensis* kultivovaných na 1/2 MS s přídavkem nebo bez přídavku růstových regulátorů tvořila květy. 90% explantátových kultur *D. binata* kultivovaných na 1/2 MS médiu obsahující růstové regulátory tvořilo květy a na médiu bez růstových regulátorů se květy netvořily (Anthony, 1992).

Při *in vitro* mikropropagaci *D. intermedia* se k založení explantátové kultury použily v *in vitro* podmínkách vyrostlé semenáčky. Nejlepších výsledků se dosáhlo na 1/4 MS médiu a přidání nízké koncentrace růstového regulátoru KIN neovlivnilo výrazně regeneraci rostlin. Rostliny téměř vždy zakořenily na 1/4 MS bez růstových regulátorů. Všechny rostliny byly úspěšně převedeny do *ex vitro* podmínek (Grevestuk et al., 2010).

Pro standardizaci podmínek pro *in vitro* množení *D. indica* bylo jako explantátů použito vzrostných vrcholů. Zvoleny byly různé koncentrace MS média 1/4, 1/3, 1/2 a základní MS, různé procento sacharózy a různé pH. Základní MS médium bylo obohaceno různými koncentracemi růstových regulátorů ZEA, KIN a BA. Regenerace výhonků byla nezávislá na koncentraci média, obsahu sacharózy a pH. Přestože počet výhonků, regenerovaných na MS médiu doplněné o růstové regulátory ZEA, KIN a BA byl poměrně vysoký, maximální počet regenerovaných výhonků byl pozorován na základním MS médiu obohacené o nižší koncentrace ZEA a KIN. Vysoká koncentrace cytokininů zapříčinila zpomalení růstu výhonků a inhibovala růst kořenů. Zakořenění se nejlépe dosáhlo na MS základním médium bez růstových regulátorů (Jayaram a Prasad, 2007).

Další kultura *in vitro* rovněž druhu *D. indica* byla založena ze semen, kultivovaných na 1/2 MS médiu obsahující GA<sub>3</sub>. Ze semenáčku starých 4 týdnů se odebraly stonkové segmenty a byly subkultivovány na 1/4 MS na tuhém médiu s přídavkem BA. Po 4 týdnech se objevily nové výhonky. Regenerované výhonky pro elongaci výhonků byly subkultivovány na 1/4 MS tekutém médiu bez růstových regulátorů. Médium se promíchávalo na rotační třepačce. Po 4 týdnech, se rostlinky pasážovaly na nové stejné médium. Po 14 dnech se použily elicitory (kvasniční extrakt, methyl jasmonát, chitosan a kyselina salicylová) v různých koncentracích na zvýšení syntézy farmakologicky využitelných účinných látek (Juengwatanatrakul et al., 2011).

Při optimalizaci metod *in vitro* mikropropagace hliznaté rosnatky *D. pelata* se sledovaly účinky 4 typů médií: MS, B5, LS a RM různé koncentrace MS média (2 MS, 1MS, 1/2 MS, 1/4 MS a 1/8 MS), různé pH a vliv různých koncentrací cytokininů KIN a BA obsažených v 1/2 MS médiu na regeneraci výhonků a tvorbu hlízek. K založení explantátové kultury se použily 1 měsíc staré vzrostné vrcholy. Na tvorbu hlízek a proliferaci výhonků se jako optimální ukázalo 1/2 MS bez přídavku cytokininů a optimální pH média bylo 5,7. Explantáty na 2 MS uhynuly z důvodu vysoké koncentrace živin v médiu. Přidání BA nebo KIN inhibovalo tvorbu výhonků a hlízek. Čím vyšší byla koncentrace cytokininů (zvláště u BA), tím větší byla inhibice růstu (Kim a Jang, 2004).

Pět druhů rodu *Drosera* bylo pěstováno v *in vitro* podmínkách ze semen: *D. adelae*, *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. cuneifolia* a *D. ramentacea*. Semena klíčila po 4-6 týdnech. Explantátová kultura *D. binata* byla založena ze vzrostných vrcholů, odebraných z dospělých rostlin pěstovaných *in vivo* v rašelině. Nejlépe regenerovaly explantáty na 1/2 MS médiu o pH 5,5. Takto namnožené rostliny byly pak použity pro extrakci sekundárních metabolitů (Marczak et al., 2005).

K založení *in vitro* kultury *D. capensis* a *D. natalensis* byly použity listové explantáty z mateční rostliny rostoucí *ex vitro* podmínkách. Explantáty se kultivovaly na 1/5 MS s přídavkem růstových regulátorů NAA a BA. Po 60 dnech, kdy rostliny nasazovaly pupeny, explantáty se postupně subkultivovaly na čerstvé médium aby započala regenerace výhonků a kořenů. Po 4 měsících se rostliny převedly do *in vivo* podmínek (Crouch et al., 1990).

Při mikropropagaci *D. gigantea* byly testovány různé růstové regulátory: NAA, IBA, TDZ, BAP a CA. Jako nejlepší se ukázalo médium 1/2 MS s 0,4% CA (Taraszkiwicz et al., 2012).

Kriticky ohrožená rosnatka na území České Republiky je *Drosera intermedia* Hayne. Při optimalizaci metod *in vitro* mikropropagace tohoto druhu se použilo základní MS médium o různých koncentracích živin 1MS, 1/2 MS, 1/4 MS a 1/8 MS, o různém obsahu sacharózy (1, 2, 3 a 4%) a různém pH. Varianty médií byly doplněné o cytokininy KIN, BAP a ZEA. Kontrolní médium bylo zvoleno 1/2 MS, s obsahem 30 g sacharózy o pH 5,7 bez růstových regulátorů. Po 60 dnech kultivace se hodnotily následující parametry: hmotnost čerstvé hmoty rostlin, délka kořenů, počet kořenů a průměr růžic. Nejlepších výsledků se dosahovalo na médiu s obsahem zeatinu o koncentraci 0,5 mg/l, na kterém bylo nejvíce výhonků na rostlinu. Ostatní varianty neukázaly nějak výrazné výsledky. Aplikace KIN a BAP se ve všech testovaných koncentracích ukázaly jako nevhodné řešení, vzhledem k dosaženým výsledkům. Rostliny, které spontánně

tvořily kořeny v *in vitro* podmínkách, byly převedeny do *ex vitro* podmínek, kde po 4 týdnech 98,5% rostlin přežilo (Rejhart a Viehmanová, 2011).

Je obtížné najít ideální médium pro *in vitro* mikropropagaci pro všechny rostliny druhu *Drosera*. Optimálních výsledků se obecně dosahuje na 1/2 MS médiu bez růstových regulátorů (Banasiuk et al., 2012).



**A: Habitus rosnatky kapské**  
Je vytrvalá bylina, která v plné zralosti může měřit až 15 cm.



**B: Celá rostlina připomínající „miniaturní palmu“**  
Listy vyrůstávají ze stonku ve spirále. Kořeny jsou drátovité.



**C: Listy**  
Řapík listu může být dlouhý až 4 cm, list až 10 cm dlouhý a 4-6 mm široký.



**E: Detail květu a květenství**



**D: Detail listu a tentakulí**  
Lepkavé listy používá jako adhezni



**F: Drobná semena**

**Obr. č. 1. A- F** Botanický a morfologie popis rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.)

**Zdroj:** <http://www.darwiniana.cz>

**Autor:** A- Kantoš D., B- Macháček M., C, D a E - Rubeš M., F- Elingr Z., 2012



## **4. Cíl práce**

---

Cílem bakalářské práce bylo sledovat vliv cytokininů na regeneraci a růst rostlin druhu rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.) v *in vitro* podmínkách. Sledované růstové regulátory byly cytokininy kinetin, který je typem syntetického cytokininu a zeatin, který je přirozeným cytokininem.

Vedlejším cílem práce bylo určení optimálního kultivačního základního MS média (Murashige a Skoog, 1962) o 1/2 MS a 1/4 MS síle média, tedy o poloviční a čtvrté koncentraci živin, jelikož složení kultivačního média ovlivňuje růst i morfogenezi kultivovaných rostlin.

Vycházelo se z hypotézy, že cytokininy mají vliv na tvorbu nadzemních částí rostlin a diferenciaci pupenů. Všeobecně cytokininy stimulují dělení buněk (cytokinezi), inhibují apikální dominanci a iniciují tvorbu adventivních pupenů a kořenů. Vysoké koncentrace cytokininů však mohou růst kořenů inhibovat. Užití přirozených cytokininů v rostlinných tkáňových kulturách jako je zeatin není příliš časté. Častěji se používají syntetické cytokininy jako je kinetin a další (Pavlová, 1992).

## **5. Materiál a metodika**

---

### **5.1. Rostlinný materiál**

Jako pokusný rostlinný materiál, který byl podkladem pro bakalářskou práci, byla vybrána masožravá rostlina z čeledi *Droseraceae* rosnatka kapská (*Drosera capensis*, Linné 1756). Tato rostlina je původem z jižní Afriky. Je ceněná jako okrasná rostlina a zároveň má potenciál pro farmaceutické využití, poněvadž extrakt z rostlinných tkání obsahuje účinné látky – chinony plumbagin a ramentaceon. Rostlinný materiál byl získán z kolekce rostlin udržovaných v *in vitro* kulturách v laboratoři rostlinných explantátů na Fakultě tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze.

### **5.2. Metodika**

#### **5.2.1. Mikropropagace**

Pro založení vlastního pokusu bylo nutné rostlinný materiál namnožit. *Drosera capensis* byla namnožena pomocí listových explantátů z původně dlouhodobě udržovaného rostlinného materiálu v *in vitro* kulturách (viz. Obraz č. 2). Listové explantáty byly kultivovány na živném médiu 1/2 MS (Murashige a Skoog, 1962) bez obsahu růstových regulátorů.



**Obraz č. 2:** Původní *in vitro* kultura *D. capensis* udržovaná na 1/2 MS médiu bez růstových regulátorů

Poté byla založena orgánová kultura druhu *D. capensis*. Jako vhodný typ explantátu se zvolily listy o průměrné délce 0,5 cm. Explantáty byly kultivovány ve 100 ml Erlenmayerových baňkách, do každé baňky bylo vloženo po 2-3 explantátech. Celkem bylo na každou variantu živného média použito 20 explantátů (listů).

Byly sledovány 2 parametry a to vliv růstových regulátorů (cytokininů) a složení kultivačního média na regeneraci a růst rostlin.

Založené orgánové kultury se kultivovaly na 2 variantách živného agarového základního MS média. Médium o poloviční koncentraci živin 1/2 MS a čtvrtěční koncentraci živin 1/4 MS, tedy o poloviční a čtvrtěční koncentraci makro i mikroelementů a vitamínů, pH média bylo upravováno na hodnotu 5,7 před autoklávováním.

Pro podporu růstu nadzemních částí rostlin byla živná média 1/2 MS a 1/4 MS doplněna o kinetin a zeatin v následujících 3 koncentracích: 0,5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$  a 5,0  $\mu\text{M}$ . Oba cytokininy byly nezávisle doplněny do živného média. Jako kontrolní média se zvolila 1/2 MS a 1/4 MS bez obsahu růstových regulátorů. Celkem bylo testováno 14 variant kultivačních médií (viz. Tab. č. 1).

**Tabulka č. 1:** Varianty kultivačních médií.

Varianta	Kultivační médium	Růstové regulátory v médiu ( $\mu\text{M}$ )		Sacharóza (g/100 ml)	Agar (g/100 ml)	pH
		Kinetin	Zeatin			
1	1/2 MS	-	-	1,5	0,8	5,7
2		0,5	-	1,5	0,8	5,7
3		2,5	-	1,5	0,8	5,7
4		5,0	-	1,5	0,8	5,7
5		-	0,5	1,5	0,8	5,7
6		-	2,5	1,5	0,8	5,7
7		-	5,0	1,5	0,8	5,7
8	1/4 MS	-	-	0,75	0,8	5,7
9		0,5	-	0,75	0,8	5,7
10		2,5	-	0,75	0,8	5,7
11		5,0	-	0,75	0,8	5,7
12		-	0,5	0,75	0,8	5,7
13		-	2,5	0,75	0,8	5,7
14		-	5,0	0,75	0,8	5,7

**Poznámka k tabulce č. 1:** Koncentrace růstových regulátorů jsou uvedeny v  $\mu\text{M}$ , ož v mg/l odpovídá: 0,5  $\mu\text{M}$  (0,1 mg/l); 2,5  $\mu\text{M}$  (0,5 mg); 5,0  $\mu\text{M}$  (1,0 mg/l). V celé praktické části bakalářské práce budou hodnoty růstových regulátorů uváděny v jednotkách  $\mu\text{M}$ .

Varianty č. 1 (1/2 MS) a č. 8 (1/4 MS) bez obsahu růstových regulátorů sloužily jako kontrolní média.

**Podmínky kultivace:** Listové explantáty ve založené ve všech variantách živných médiích byly umístěny do kultivačního boxu o svítivosti 3000 lx, s denní fotoperiodou 16/8 h den/noc, teplota ve dne byla 25°C a v noci 20°C. V průběhu pokusu se založená kultura pravidelně kontrolovala a sledoval se její zdravotní stav, resp. výskyt kontaminací, jelikož kultivační média obsahují organické složky, které jsou vhodnou živnou půdou pro mikroorganismy a proto je nutné médium i kulturu udržovat sterilní a při manipulaci dodržovat zásady aseptické práce. Při zjištění kontaminace se založila nová kultura od dané varianty živného média.

Založené varianty pokusu se kultivovaly po dobu 6 měsíců (kultivační doba). Poté bylo provedeno hodnocení vlivu cytokininů na regeneraci a růst rostlin.

### 5.2.2. Hodnocení výsledků

Na konci pokusu se hodnotily parametry jako hmotnost čerstvé hmoty rostlin, počet trsů, počet listů na trsu, počet kořenů, a zda se tvořil kalus v závislosti na složení kultivačního média.

Získaná data byla tabulkově zpracována v MS Excel a použita k výpočtu tzv. „koeficientu mikropropagace“, který slouží jako hlavní kritérium pro posouzení účinnosti jednotlivých mikropropagačních systémů. Pokud jsou jednotlivé systémy mikropropagace posuzovány podle počtu rostlin, které je možno získat za určité časové období, je nutné kromě koeficientu mikropropagace brát zřetel i na počet subkultivací, který je možný za toto období uskutečnit. Na základě těchto dvou parametrů (koeficientu mikropropagace a počtu subkultivací za rok) je možno vypočítat teoretický počet rostlin, který je možno získat podle rovnice:

$$N = k^p$$

**Kde:**  $N$  je teoretický počet rostlin za rok  
 $k$  je koeficientem mikropropagace  
 $p$  je počet subkultivací za rok

## **6. Výsledky a diskuze**

Výhodou metod množení v *in vitro* podmínkách je, že rostlinný materiál se může po celý rok a poměrně rychle množit na malém prostoru, kde se dají regulovat podmínky kultivace. Ve studii byla založena orgánová kultura z listů *D. capensis*. Orgánové kultury a metody *in vitro* množení se aplikují ve vědeckých i komerčních laboratořích zabývajících se studiem nebo propagací okrasných, užitkových či ohrožených rostlin.

Získané výsledky ze sledovaného výzkumu jsou shrnuty v Tabulce č. 2 a 3. Rovněž byla pořízena fotodokumentace výsledků pokusu v Obrazech č. 3 a 4.

Procento regenerace rostlin z listových explantátů se pohybovalo od 86 do 100% dle varianty média. Rostliny nejlépe regenerovaly (100%) v kontrolních variantách (1/2 a 1/4 MS médiu) a na médiu 1/2 MS s přidavkem 0,5  $\mu\text{M}$  kinetinu, horší regeneraci měly explantáty pěstované na 1/4 MS s přidavkem zeatinu. Celkové zvýšení koncentrace kinetinu a zeatinu v živném médiu procento regenerace snižuje.

Asi po 1 měsíci kultivace se na explantátech, ve většině variant, objevily první adventivní pupeny a poté výhony. Nově zregenerované rostliny na 1/2 a 1/4 MS médiu bez růstových regulátorů (kontrolní média) byly svěže zelené a spontánně tvořily kořeny.

Jedním z hodnocených parametrů byl průměrný počet nově zregenerovaných listů na explantát. Dle získaných výsledků se počet nově vytvořených listů pohyboval v rozmezí od  $8,00 \pm 4,64$  až  $19,30 \pm 4,30$ . Rovněž i v tomto případě byl získán nejvyšší počet nově vytvořených listů na kontrolních kultivačních médiích, a to  $19,30 \pm 4,30$  na 1/2 MS a na 1/4 MS  $18,80 \pm 4,60$ . V porovnání vlivu kinetinu a zeatinu na regeneraci nových listů nejlepší výsledky byly získány na médiích s přidavkem kinetinu (na 1/2 MS od  $16,00 \pm 2,83$  do  $17,50 \pm 3,67$  a na 1/4 MS od  $12,00 \pm 4,47$  do  $13,75 \pm 2,36$ ) než zeatinu (na 1/2 MS od  $9,89 \pm 4,34$  do  $15,50 \pm 5,26$  a na 1/4 MS od  $8,00 \pm 4,64$  do  $9,60 \pm 4,93$ ). I zde platí, že čím byla vyšší koncentrace kinetinu a zeatinu v kultivačních médiích, tím byl i menší počet nově vytvořených listů od jednotlivého explantátu.

Tvorba biomasy (čerstvá hmotnost rostlin) na konci kultivační doby (po 6. měsících) se pohybovala v rozmezí od  $0,0547 \pm 0,01$  g do  $1,0291 \pm 1,41$  g. Průměrně nejvíce biomasy tvořily explantáty kultivované na 1/4 MS s přidavkem 2,5  $\mu\text{M}$  zeatinu a to od  $1,0291 \pm 1,41$ g. Regenerované rostliny na médiu s vyšším obsahem obou cytokininů měly menší vzrůst než rostliny na médiu bez obsahu růstových regulátorů. Celkově větší tvorba biomasy byla zaznamenána ve variantách s přidavkem růstových regulátorů oproti kontrolním variantám médií. Ale výsledky mohly být ovlivněny tvorbou

kalusu ve variantách média s přidavkem růstových regulátorů, hlavně ve vyšších koncentracích. Indukce kalusu není u mikropropagace žádoucí, pokud chceme získat uniformní rostliny, jelikož může vést ke genetické nestabilitě regenerovaných rostlin. Kalusy byly kompaktní, zeleně místy až červeně zbarvený a diferenciovaly se na něm malé rostliny. Ke konci pokusného období byly již některé explantáty postiženy procesem stárnutím, projevující se poklesem vitality a postupným usycháním listů.

Hlavním kritériem mikropropagace je produkce nově vytvořených výhonů (nadzemních částí, v případě pokusu) na explantátu (koeficient mikropropagace). V tomto ohledu bylo dosaženo lepších výsledků v médiích s obsahem kinetinu než zeatinu. Koeficient mikropropagace se po 6 měsících kultivace (čas subkultivace) pohybuje od 1 : 8,0 do 1 : 19,3 (tj. 8,0 a 19,3 nově vytvořených listů na jeden původní explantát). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce č. 3. Teoretické počty rostlin, které je možno získat z jednoho explantátu za 1 rok se za použitých kultivačních podmínek pohybovaly od 64 do 372,49 rostlin. V praxi do procesu mikropropagace zasahuje mnoho faktorů jako například: kontaminace, produktivita a intenzita práce v laboratoři. Tyto faktory nejsou součástí teoretického výzkumu, ale mají vliv na účinnost mikropropagace. Dalším důležitým faktorem, který může ovlivnit účinnost mikropropagace je velikost explantátů. Explantáty o optimální velikosti 0,5 cm lépe regenerovaly než explantáty o menší velikosti.

Dle získaných výsledků pro pěstování *D. capensis* v kulturách *in vitro* pomocí listových explantátů není zapotřebí přidat do živného média růstové regulátory (kinetin a zeatin), protože lepší procento regenerace a vyšší počet nově vytvořených listů na původní explantát byl zaznamenán v kontrolních variantách bez obsahu růstových regulátorů. A v porovnání mezi médiem 1/2 MS a 1/4 MS byly lepší výsledky (procento regenerace a počet nově vytvořených listů na původní explantát) dosaženy na 1/2 MS médiu ve všech variantách.

Dosažené výsledky v této studii potvrzují i výsledky studií jiných autorů. Anthony (1992) použil ve své studii listové explantáty třech druhů rosnatek *D. rotundifolia*, *D. binata* a *D. capensis*, a potvrzuje, že nejlépe regenerovaly explantáty na 1/2 a 1/4 MS. Rovněž tyto výsledky potvrzují autoři Banasiuk et al. (2012), Perica a Berljak (1996), kteří uvádějí pro mikropropagaci rosnatek za optimální kultivační médium 1/2 MS bez obsahu růstových regulátorů.

Ve studii o mikropropagaci jiného druhu rosnatky *D. indica*, kde se jako explantáty použily vzrostné vrcholy, autoři Jayaram a Prasad (2007) pozorovali maximální počet regenerovaných výhonků na základním MS médiu obohacené o nižší koncentrace cytokininů ZEA a KIN. Vyšší koncentrace cytokininů zapříčinila zpomalení růstu

nadzemní části rostlin a inhibovala růst kořenů. Explantáty tvořily kořeny na základním MS médium bez obsahu růstových regulátorů. Rovněž Jayaram a Prasad (2005) ve své jiné studii o mikropropagaci druhů *D. indica* a *D. burmanii* pomocí výhonů. Explantáty dobře regenerovaly na MS médiu doplněné o nižších koncentrací cytokininů KIN, ZEA a BAP. Oba druhy při vyšších koncentracích cytokininů rovněž inhibovaly svůj růst. Rostliny opět úspěšně zakořenily kultivované na základním MS médiu bez obsahu růstových regulátorů. Což potvrzuje, že vyšší dávky cytokininů mají inhibiční vliv na tvorbu kořenů a rovněž na regeneraci a růst explantátů (Bobák et al., 1995; Kim a Jang, 2004; Grevenstuk et al., 2010; Banasiuk et al., 2012).

Ale jiní autoři dosáhli lepších výsledků v médiích s obsahem růstových regulátorů, konkrétně při mikropropagaci druhu *D. aliciae*. Regenerace listových explantátů na 1/2 MS médiu velmi malá a po přidání BA, se zvýšila šance na přežití a rovněž se zvýšil koeficient mikropropagace explantátů (Kawiak et al., 2011). Při mikropropagaci *D. gigantea* Taraszkiewicz et al. (2012) testovaly různé růstové regulátory: NAA, IBA, TDZ, BAP a CA. Nejlepších výsledků dosáhli v médiu 1/2 MS s 0,4% CA.

**Tabulka č. 2:** Vliv kinetinu a zeatinu na regeneraci a růst listových explantátů v kultuře *in vitro* *D. capensis* kultivované na 1/2 a 1/4 MS médiu.

Kultivační Média	Koncentrace kinetinu ( $\mu\text{M}$ )	Koncentrace zeatinu ( $\mu\text{M}$ )	Procento regenerace (%)	Průměrný počet listů na 1 trsu (ks)	Průměrná čerstvá hmotnost (g)	Tvorba kalusu
1/2 MS	-	-	100	$19,30 \pm 4,30$	$0,1126 \pm 0,36$	-
	0,5	-	100	$17,50 \pm 3,67$	$0,1509 \pm 0,16$	-
	2,5	-	98	$16,00 \pm 2,83$	$0,0824 \pm 0,01$	-
	5,0	-	95	$16,00 \pm 3,74$	$0,1309 \pm 0,12$	+
	-	0,5	95	$15,50 \pm 5,26$	$0,0547 \pm 0,01$	-
	-	2,5	90	$14,50 \pm 5,25$	$0,8646 \pm 0,19$	+
	-	5,0	90	$9,89 \pm 4,34$	$0,3928 \pm 0,33$	+
1/4 MS	-	-	100	$18,80 \pm 4,60$	$0,1071 \pm 0,04$	-
	0,5	-	95	$13,75 \pm 2,36$	$0,1303 \pm 0,07$	-
	2,5	-	95	$13,14 \pm 4,64$	$0,1960 \pm 0,10$	-
	5,0	-	90	$12,00 \pm 4,47$	$0,9860 \pm 0,05$	+
	-	0,5	89	$9,60 \pm 4,93$	$0,1857 \pm 0,12$	-
	-	2,5	87	$8,60 \pm 5,13$	$1,0291 \pm 1,41$	+
	-	5,0	86	$8,00 \pm 4,64$	$0,1293 \pm 0,12$	+

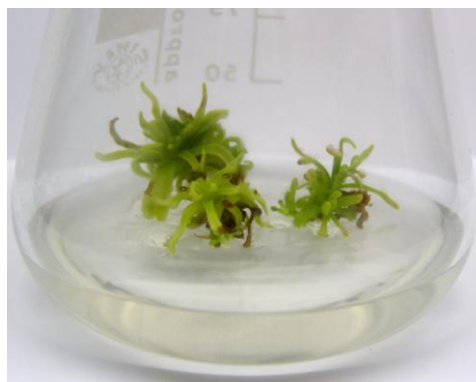


**Tabulka č. 3:** Účinnost mikropropagace v závislosti na „koeficientu mikropropagace“ orgánových kultur *D. capensis* založených z listů, kultivovaných na 1/2 a 1/4 MS médiu s přidavkem kinetinu a zeatinu.

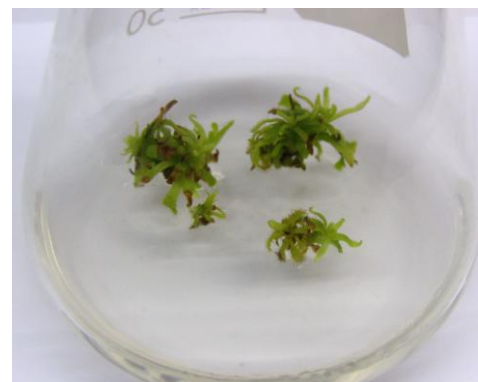
Kultivační Média	Koncentrace kinetinu ( $\mu\text{M}$ )	Koncentrace zeatinu ( $\mu\text{M}$ )	Doba subkultivace (v měsících)	Koeficient mikropropagace ( $k$ )	Počet subkultivací za rok ( $p$ )	Teoretický počet získaných rostlin za rok ( $N$ )
1/2 MS	–	–	6	1 : 19,30	2	372,49
	0,5	-	6	1 : 17,50	2	306,00
	2,5	-	6	1 : 16,00	2	256,00
	5,0	-	6	1 : 16,00	2	256,00
	-	0,5	6	1 : 15,50	2	240,25
	-	2,5	6	1 : 14,50	2	210,25
	-	5,0	6	1 : 9,89	2	97,81
1/4 MS	-	-	6	1 : 18,80	2	331,00
	0,5	-	6	1 : 13,75	2	283,00
	2,5	-	6	1 : 13,14	2	172,66
	5,0	-	6	1 : 12,00	2	144,00
	-	0,5	6	1 : 9,60	2	92,16
	-	2,5	6	1 : 8,60	2	73,96
	-	5,0	6	1 : 8,00	2	64,00



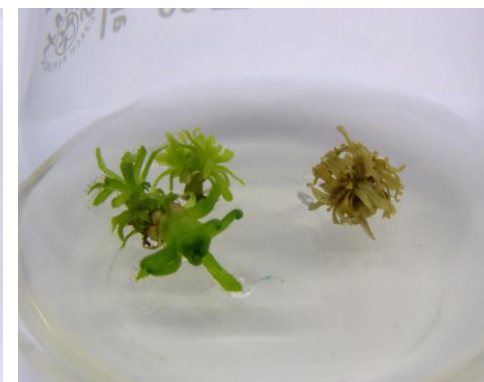
**1/2 MS médium bez růstových regulátorů (kontrolní médium)**



**1/2 MS + 0,5 μM KIN**



**1/2 MS + 2,5 μM KIN**



**1/2 MS + 5,0 μM KIN**



**1/2 MS + 0,5 μM ZEA**



**1/2 MS + 2,5 μM ZEA**

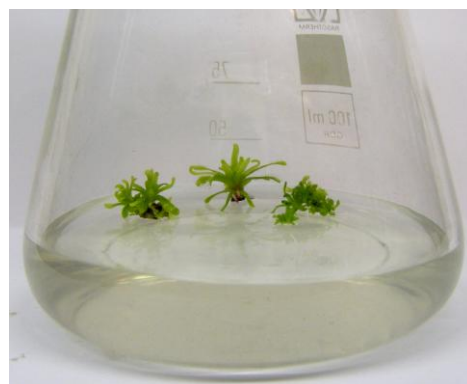


**1/2 MS + 5,0 μM ZEA**

**Obraz č. 3:** Fotodokumentace z pokusu mikropropagace druhu *D. capensis*, Regenerace rostlin z listových explantátů kultivovaných na 1/2MS médiu s přidávkem kinetinu a zeatinu po 6. měsících kultivace.



**1/4 MS médium bez růstových regulátorů (kontrolní médium)**



**1/4 MS + 0,5 μM KIN**



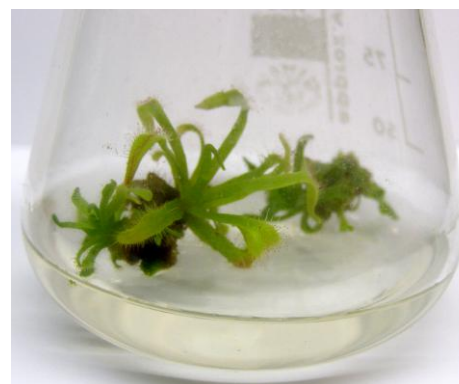
**1/4 MS + 2,5 μM KIN**



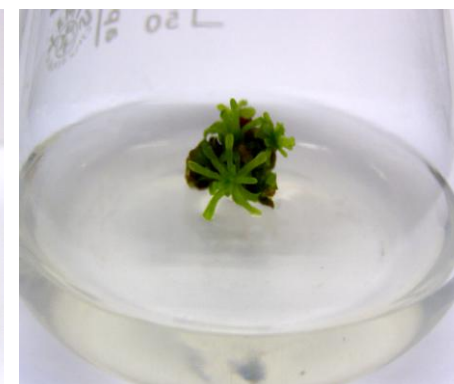
**1/4 MS + 5,0 μM KIN**



**1/4 MS + 0,5 μM ZEA**



**1/4 MS + 2,5 μM ZEA**



**1/4 MS + 5,0 μM ZEA**

**Obraz č. 4:** Fotodokumentace z pokusu mikropropagace druhu *D. capensis*, Regenerace rostlin z listových explantátů kultivovaných na 1/4MS médiu s přidavkem kinetinu a zeatinu po 6. měsících kultivace.

## 7. Závěr

---

Základním cílem této práce bylo sledování vlivu cytokininů na regeneraci a růst rostlin druhu rosnatky kapské (*Drosera capensis* L.) v *in vitro* podmínkách. Vedlejším cílem práce bylo určení optimálního kultivačního základního MS média (Murashige a Skoog, 1962). Mohou se tak vyvinout či ověřit vhodné metody pro efektivní mikropropagaci této rosnatky. Vycházelo se z hypotézy, že cytokininy mají pozitivní vliv na tvorbu nadzemních částí rostliny a složení kultivačního média ovlivňuje růst i morfogenezi kultivovaných rostlin.

V této studii se nepotvrdila hypotéza pozitivního vlivu cytokininů (kinetinu a zeatinu) na regeneraci růst nadzemní části *D. capensis* při mikropropagaci pomocí listových explantátů, pokud je účelem získat identické jedince. Pro jiné účely výzkumu mohou mít růstové regulátory pozitivní vliv. Ve variantách s vyšší koncentrací sledovaných růstových regulátorů (cytokininů) u explantátů byla zaznamenána tvorba kalusu.

Dle získaných výsledků pro pěstování *D. capensis* v kulturách *in vitro* pomocí listových explantátů není zapotřebí přidat do kultivačního média růstové regulátory (kinetin a zeatin), protože lepší procento regenerace a vyšší počet nově vytvořených listů byl zaznamenán v kontrolních variantách bez obsahu růstových regulátorů. V porovnání mezi médiem 1/2 MS a 1/4 MS, byly lepší výsledky (procento regenerace a počet nově vytvořených listů na původní explantát) dosaženy na 1/2 MS médiu ve všech variantách.

Je obtížné najít ideální kultivační médium pro mikropropagaci, které by bylo všeobecně vhodné pro všechny druhy rodu *Drosera*, ale optimálních výsledků se obecně dosahuje na 1/2 MS médiu bez obsahu růstových regulátorů.

## 8. Použitá literatura

---

- Anthony J. L. 1992:** *In Vitro* propagation of *Drosera* spp. HortScience 27:850.
- Arditti J. 1968:** Germination and growth of orchids on banana fruit tissue and some of its extracts. American Orchid Society Bulletin 37:112–116. Cit. in: **Chugh S., Guha S., Rao Usha I. 2009:** Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae 122:507–520.
- Aslam J., Mujib A., Sharma Prasad M. 2013:** *In vitro* micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. Saudi Journal of Biological Sciences 20:63-68.
- Banasiuk R., Kawiak A., Królicka A. 2012:** *In vitro* cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology 93:87-96.
- Biteau F., Nisse E., Hehn A., Miguel S., Hannewald P., Bourgaud F. 2011:** A Rapid and Efficient method for isolating high quality DNA from leaves of carnivorous plants from the *Drosera* genus. Mol Biotechnol 51:247–253.
- Bobák M., Blehová A., Krištín J., Ovečka M., Šamaj J. 1995:** Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:43-49.
- Bruzzese B.M., Bowler R., Massicotte H.B., Fredeen A.L. 2010:** Photosynthetic light response in three carnivorous plant species: *Drosera rotundifolia*, *D. capensis* and *Sarracenia leucophylla*. Photosynthetica 48: 103-109.
- Crouch I.J., Finnie J.F., van Staden J. 1990:** Studies on the isolation of plumbagin from *in vitro* and *in vivo* grown *Drosera* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 79-82. Cit. in: **Jayaram K., Prasad M.N.V. 2007:** Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera indica* L.: A vulnerable, medicinally important insectivorous plant. Plant Biotechnol Rep 1:79–84.
- Grevenstuk T., Coelho N., Gonçalves S., Romano A. 2010:** *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* in a single step. Biologia Plantarum 54: 391-394.
- Gonçalves S., Romano A. 2013:** *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances 31:166-174.
- Cheers G. 1992:** Letts Guide to Carnivorous Plants of the World. London. Charles Letts & Co Ltd, 174 s.

- Chen L., Wang Y., Xu Ch., Zhao M., Wu J. 2006:** *In vitro* propagation of *Lychnis senno* Siebold et Zucc., a rare plant with potential ornamental value. *Scientia Horticulturae* 107(2006): 183–186.
- Jayaram K., Prasad M.N.V. 2007:** Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnol Rep* 1:79–84.
- Jayaram K., Prasad M.N.V. 2005:** Rapidly *in vitro* multiplied *Drosera* as reliable source for plumbagin bioprospection. *Current Science*, 89:447-448.
- Ježek Z. 2003:** Masožravé rostliny. Praha. Květ, 64 s.
- Juengwatanatrakul T., Sakamoto S., Tanaka H., Putalun W. 2011:** Elicitation effect on production of plumbagin in *in vitro* culture of *Drosera indica* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 19:4949-4953.
- Lecoufle M. 1993:** Carnivorous Plants: Care and Cultivation. London. Cassell, 144 s.
- Kawiak A., Królicka A., Łojkowska E. 2003:** Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 175-178.
- Kawiak A., Królicka A., Łojkowska E. 2011:** *In vitro* cultures of *Drosera aliciae* as a source of a cytotoxic naphthoquinone: ramentaceone. *Biotechnol Lett* 33:2309–2316.
- Kováč J. 1995:** Explantátové kultury rostlin. Olomouc Universita Palackého v Olomouci, 146 s.
- Krolicka A., Szpitter A., Stawujak K., Baranski R., Gwizdek-Wisniewska A., Skrzypczak A., Kaminski M., Łojkowska E. 2010:** Teratomas of *Drosera capensis* var. *alba* as a source of naphthoquinone: ramentaceone. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 103:285–292.
- Kim K., Jang G. 2004:** Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell Tissue Organ* 77:211–214.
- Marczak L., Kawiak A., Łojkowska E., Stobiecki M. 2005:** Secondary metabolites in *in vitro* cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochemical Analysis* 16:143–149.
- Pati P.K., Rath S.P., Sharma M., Sood A., Ahuja P.S. 2006:** *In vitro* propagation of rose – A review. *Biotechnology Advances* 24:94–114.
- Pavlová L. 1992:** Kultury rostlin *in vitro*. Praha. Česká zemědělská univerzita v Praze – Agronomická fakulta, 85 s.
- Pásek K. 2006:** Masožravé rostliny: Podrobný návod k pěstování. Praha. Grada Publishing a.s., 96 s.
- Perica Curkovic M., Berljak J. 1996:** *In vitro* growth and regeneration of *Drosera spatulata* Labill. on variol media. *HortScience* 31:1033–1034.

- Putalun W., Udomsin O., Yusakul G., Juengwatanatrakul T., Sakamoto S., Tanaka H. 2010:** Enhanced plumbagin production from *in vitro* cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. *Biotechnol Lett* 32:721–724.
- Rejthar J., Viehmannová. 2011:** An efficient *in vitro* multiplication of *Drosera intermedia* Hayne. In: 5th Scientific Conference of Institute of Tropics and Subtropics – Book of abstracts. Prague. Czech University of Life Sciences in Prague, 56 s.
- Studnička M. 2006:** Masožravé rostliny: Objekt badatelů, dobrodruhů a snilků. Praha. Academia, 336 s.
- Studnička M. 1984:** Masožravé rostliny. Praha. Academia, 152 s.
- Studnička, M., Franta J. a Spousta M. 2010:** Masožravé rostliny a jejich bydliště: Katalog k výstavě. Liberec. Botanická zahrada Liberec, 183 s.
- Sysová B. 2012:** Induced polyploidization *in vitro* of selected *Droseraceae* species. Praha. Česká zemědělská univerzita v Praze – Fakulta tropického zemědělství, 85 s.
- Švarc D. 2003:** Masožravé rostliny. Tišnov. Sursum, 180 s.
- Taraszkiewicz A., Jafra S., Skrzypczak A., Kaminski M., Krolicka A. 2012:** Antibacterial activity of secondary metabolites from *in vitro* culture of *Drosera gigantea* against the plant pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* and *P. syringae* pv. *Morsprunorum*. *Journal of Plant Pathology* 94:63–68.
- van Waes J. 1985:** Vermenigvuldiging van zonnedaauw (*Drosera*) in proefbuizen. *Verbondsnieuws* 29:547–551. Cit. in: **Jayaram K., Prasad M.N.V. 2007:** Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnol Rep* 1:79–84.
- Ziaratnia SM, Kunert KJ, Lall N. 2009:** Elicitation of 7-methyljuglone in *Drosera capensis*. *S Afr J Bot* 75:97–103.
- Zoun M. 2006:** Masožravé rostliny. Brno. Computer Press, 64 s.