

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



**Možnosti regenerace plamenky latnaté (*Phlox paniculata*)
v podmínkách *in vitro***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ondřej Šašek

Obor studia: Šlechtění rostlin

Vedoucí práce: Ing. Pavel Matiska, Ph.D.

© 2016/2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnosti regenerace plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in vitro*" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2017 _____

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) Ing. Pavlu Matiskovi, Ph.D. za rady a vedení v průběhu práce, Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za konzultace a Ing. Ivě Viehmannové, Ph.D. za pomoc s průtokovou cytometrií.

Možnosti regenerace plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in vitro*

V této práci je testován vliv tří auxinů (IAA, NAA, 2,4-D) a dvou cytokininů (BAP a TDZ) na různé výchozí explantáty dvou odrůd plamenky latnaté (*Phlox paniculata*), bíle kvetoucí 'Fuji' a růžové s výrazným okem - 'Miss Pepper'. Kultivace probíhala na Murashige and Skoog médiu (MS). Jako explantáty jsou zde testovány listové segmenty z rostlin pěstovaných ve skleníku a *in vitro*, kořenové a nodální segmenty z *in vitro* kultury, různé typy získaných kalusů a okvětní lístky a prašníky ze skleníkových donorových rostlin. Cílem je mapovat různé reakce explantátů na působení zvolených regulátorů rostlinného růstu, jejich důkladné vyhodnocení a nalezení efektivních kombinací typů explantátů a složení kultivačních médií pro maximální zisk regenerovaných rostlin. Další částí práce je pak indukce androgenese z prašnickových explantátů odrůdy 'Miss Pepper' s cílem získat haploidní rostliny, které by mohly být následně využity ve šlechtění. Jako nejvíce perspektivní byly hodnoceny varianty, které indukovaly kaulogenezi (vznik výhonů), tyto varianty jsou také nejdůkladněji vyhodnoceny. Bylo prokázáno, že v případě listových explantátů je pro kaulogenezi klíčové působení TDZ, které je v případě listů ze skleníkových rostlin vhodné doplnit IAA. Při použití kořenových explantátů je pro zisk výhonů nejlepší použití čistého MS média nebo varianty doplněné o BAP, zde byl pozorován velký rozdíl mezi odrůdami, protože 'Miss Pepper' z kořenů tvořila výhony velmi špatně. V případě nodálních segmentů nebyly pozorovány významné rozdíly, nejlepších výsledků dosáhlo u 'Fuji' použití čistého MS a u 'Miss Pepper' 2 mg.l⁻¹ BAP nebo 0,25 mg.l⁻¹TDZ. Pro prašnickové kultury bylo použito nejprve MS médium s 9 % sacharózy a následně MS se 3 %. Nejlepších výsledků při indukcii kalusu z prašníků dosahovala varianta 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ TDZ, která indukovala růst kalusu ve 40,830 % případů. Ze 2 kalusů byly vypěstovány rostliny, z nichž jedna vykazovala výrazné odlišnosti a vykvetla. Získané výhony byly spolu s dalšími kalusy testovány průtokovou cytometrií a přítomnost haploidů byla u regenerovaných rostlin vyloučena, všechny byly diploidní. Pouze jeden testovaný kalus vykazoval přítomnost 1n a 4n buňek, 2n zastoupeny nebyly. Tento perspektivní kalus je dále pasážován k dalšímu dopěstování.

Klíčová slova: *Phlox*, regenerace, kaulogeneze, androgenese, *in vitro*

Possibilities of Regeneration of Garden Phlox (*Phlox paniculata*) in Condition *in vitro*

In this thesis, an impact of three auxins (IAA, NAA, 2,4-D) and two cytokinins (BAP and TDZ) is tested on different explants of 2 cultivars of garden phlox (*Phlox paniculata*), white blooming “Fuji” and pink “Miss Pepper” with a pronounced eye. The cultivation was taking place on Murashige and Skoog medium (MS). Leaf segments from plants grown in a greenhouse and *in vitro*, root and nodal segments from *in vitro* culture, different types of acquired calluses and flower petals and anthers from donor plants grown in a greenhouse were all tested. The aim is to map different reactions of explants on the effect of chosen regulators of the plant growth, their thorough evaluation and the determination of effective combinations of explant types and the composition of cultivation mediums for the maximum gain of regenerated plants. The following part of this paper is then the induction of androgenesis from anther explants of cultivar called “Miss Pepper” with aim to obtain a haploid plants, which could be subsequently used in breeding. As the most perspective were evaluated the variants, which induced caulogenesis (the creation of shoots); these variants are also most thoroughly evaluated. It was proved that, in the case of leaf explants the effect of TDZ is essential for caulogenesis; in the case of greenhouse plants it is appropriate to supply TDZ with IAA. For the acquisition of shoots while using root explants it is the most suitable to use pure MS medium or the variants completed with BAP; there the huge difference between various cultivars was observed, since “Miss Pepper” created shoots very poorly from roots. In the case of nodal segments, no significant differences were observed; the best outcomes were achieved by using pure MS concerning “Fuji” and mg.l^{-1} BAP or 0,25 mg.l^{-1} TDZ concerning “Miss Pepper”. For the anther cultures, firstly, MS medium with 9% sucrose was used and subsequently MS with 3%. The best results were achieved during the induction of callus growth from anthers by the combination of 2 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} TDZ, which had induced the growth of callus in 40,830% of cases. From the two calluses were grown plants, from which one showed significant differences and flowered. Obtained shoots along with other calluses were tested with flow cytometry and the presence of haploids was excluded in the case of regenerated plants, since all were diploid. Only one callus tested showed the presence of 1n and 4n cells, 2n cells were not represented. This one perspective callus is further passaged for future cultivation.

Key Words: *Phlox*, Regeneration, Caulogenesis, Androgenesis, *in vitro*

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
Plamenka Latnatá (<i>Phlox paniculata</i>)	3
3.1.1 Specifikace druhu a jeho pěstování	3
3.1.2 Použité odrůdy	4
3.1.2.1 'Mt. Fuji'	4
3.1.2.2 'Miss Pepper'	5
Obecně o kulturách <i>in vitro</i>	5
Využití fytohormonů a regulátorů rostlinného růstu	5
3.1.3 Auxiny	6
3.1.3.1 Kyselina indolyl-3-octová (IAA)	7
3.1.3.2 Kyselina α -naftyloctová (NAA)	8
3.1.3.3 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)	8
3.1.4 Cytokininy	9
3.1.4.1 6-benzylaminopurin (BAP)	9
3.1.4.2 Thidiazuron (TDZ)	10
3.1.5 Stručný popis a příklady využití dalších fytohormonů	11
3.1.5.1 Gibereliny	11
3.1.5.2 Kyselina abscisová	11
Kultivace a regenerace rostlin v podmínkách <i>in vitro</i>	11
3.1.6 Regenerace ze založených základů	13
3.1.7 Organogeneze	14
3.1.7.1 Obecně	14
3.1.7.2 Dosavadní poznatky o organogenezi u <i>P. paniculata</i>	16
3.1.8 Somatická embryogeneze	18
3.1.8.1 Obecně	18
3.1.8.2 Dosavadní poznatky o somatické embryogenezi u <i>P. paniculata</i>	19
3.1.9 Androgeneze	20
3.1.9.1 Obecně	20
3.1.9.2 Předpoklady pro úspěšnou indukci androgeneze	21
3.1.9.3 Využití	23

3.1.9.4	Prašníková kultura u <i>Phlox drummondii</i>	23
3.1.9.5	Další příklady androgeneze	24
4	Metodika	24
	Použité vybavení	24
	Použité varianty regulátorů rostlinného růstu a kultivační média	25
4.1.1	Kultivační média.....	25
4.1.2	Regulátory rostlinného růstu a jejich kombinace.....	26
	Stanovení podmínek kultivace	28
	Pokus č. 1 - listové segmenty	29
4.1.3	Desinfekce listů z rostlin kultivovaných ve skleníku	29
4.1.4	První část pokusu- screening	29
4.1.5	Druhá část pokusu	30
	Pokus č. 2 - kořenové segmenty	31
4.1.6	První část pokusu - screening	31
4.1.7	Druhá část pokusu	32
	Pokus č. 3 - kalusy.....	33
	Pokus č. 4 - nodální segmenty	34
	Pokus č. 5 - okvětní lístky	34
4.1.8	Desinfekce okvětních lístků	35
	Pokus č. 6 - nezralé prašníky, androgeneze.....	35
4.1.9	Stanovení optimální zralosti prašníků a velikosti pupat pro odběr.....	35
4.1.10	Odběr a desinfekce prašníků	36
4.1.11	Indukce tvorby kalusu a následná multiplikace.....	36
4.1.12	Regenerace výhonů	37
4.1.13	Testování ploidie regenerantů - průtoková cytometrie	37
	Metodika zpracování výsledků.....	38
5	Výsledky	39
	Pokus č. 1 - listové segmenty	39
5.1.1	První část - screening	39
5.1.2	Druhá část	44
	Pokus č. 2 - kořenové segmenty	47
5.1.3	První část - screening	47
5.1.4	Druhá část	51
	Pokus č. 3 - kalusy.....	55
	Pokus č. 4 - nodální segmenty	57
	Pokus č. 5 - okvětní lístky	60
5.1.5	Desinfekce okvětních lístků	60

Pokus č. 6 - prašníky, androgenese.....	60
5.1.6 Ověření optimální zralosti prašníků a poupat	60
5.1.7 Desinfekce poupat	61
5.1.8 Indukce tvorby kalusu	62
5.1.9 Multiplikace kalusů a indukce organogeneze.....	62
5.1.10 Testování ploidie regenerantů.....	65
6 Diskuse.....	67
7 Závěr	74
8 Zdroje.....	75
Internetové zdroje.....	78
9 Seznam použitých zkratk	79
10 Přílohy.....	Chyba! Záložka není definována.

1 Úvod

Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*) je známá a oblíbená trvalka z čeledi *Polemoniaceae*, která je velmi rozšířena v sadovnictví. Za dobu co je tento druh v kultuře, bylo vyšlechtěno velké množství odrůd, které je ovšem nutné množit pouze vegetativní cestou. Některé odrůdy velice špatně tvoří semena a i ty které je tvoří relativně normálně se jimi množí pouze s cílem šlechtění a selekce zajímavých fenotypů. Tyto odrůdy totiž v generativním potomstvu výrazně štěpí a ztrácí své definované a požadované vlastnosti. Je tedy na místě rozvíjet efektivní techniky vegetativního množení *in vitro*, které poskytují výrazně vyšší množitelský koeficient než běžně používané metody jako je dělení trsů nebo řízkování, na které je přeci jen potřeba větší část výhonu.

Explantátové kultury nachází využití při velice intenzivním množení mnoha druhů okrasných, ale především hospodářsky významných rostlin. V tomto množení je především využito různých forem organogeneze z nichž nejvýznamnější je kaulogeneze - tvorba výhonů, ale organogenezí mohou vznikat i jiné orgány a části rostlin, které mají mnoho různých využití. Další možností je somatická embryogeneze ve které je indukována tvorba somatických embryí z různých zdrojových explantátů, tyto embrya mohou být využita například k výrobě syntetických semen.

In vitro kultury ale mají své uplatnění také ve šlechtitelství, kde umožňují selekci a práci s mutacemi nebo například získání haploidních a polyploidních jedinců. Haploidní rostliny vzniklé procesem androgenese nebo gynogenese slouží ke studijním účelům, ale především jako cenný šlechtitelský materiál, protože jejich diploidizací vznikají takzvané dihaploidní rostliny, které jsou kompletně homozygotní. Další z mnoha využití rostlinných explantátů kultivovaných *in vitro* je například uchování cenného genetického materiálu v genových bankách.

2 Cíl práce

Cílem práce je experimentální testování různých regulátorů rostlinného růstu a jejich kombinací na 6 typů explantátů plamenky latnaté (*P. paniculata*) a mapování následných reakcí se zaměřením na efektivní množení nebo získání materiálu s perspektivou využití ve šlechtění.

Testovaná hypotéza:

U druhu plamenka latnatá je v podmínkách *in vitro* možno díky totipotenci rostlinných buněk dosáhnout regenerace nových rostlin při použití libovolného orgánu nebo části donorové rostliny.

3 Literární rešerše

Plamenka Latnatá (*Phlox paniculata*)

3.1.1 Specifikace druhu a jeho pěstování

Plamenku latnatou (*Phlox paniculata*, syn. *P. decussata*) popisují Golovkin a kol. (1986), Rice (2006) a Brickell (2008) a jako jednu z nejoblíbenějších zahradních trvalek s vrcholem kvetení v létě. Pochází z východní části USA, kde roste na vlhkých a úrodných říčních naplaveninách. Vyznačuje se tvorbou trsů, jednotlivé stonky jsou nevětvené, tuhé, přímé a olistěné po celé délce. V závislosti na odrůdě dorůstají 60 - 120 (150) cm. Listy vyrůstají vstřícně, jsou přisedlé, kopinaté až dlouze kopinaté a dosahují velikosti 5 - 15 cm. Kvete od léta do brzkého podzimu, jednotlivé květy jsou velké 1,5 - 5 cm, vonné, mají dlouhou trubku rozvíjející se do pěti plochých korunních plátků a tvoří velmi bohatá vrcholová květenství typu lata, která jsou často doplněna menšími latami vyrůstajícími z paždí listů v horní části rostliny. Také díky tomu mohou kvést i déle než 5 týdnů. Intenzivním šlechtěním zahradních plamének bylo získáno velké spektrum barev květů od sněhově bílé, růžové a fialové až po oranžové a červené. V současném sortimentu je také velké množství vícebarevných a panašovaných odrůd. Matiska (2009) uvádí, že současné odrůdy jsou často potomky křížení více druhů rodu *Phlox* - *P. paniculata*, *P. maculata* a *P. carolina*. Dle Meyera (1944) má *P. paniculata* v základu 14 chromozomů (2n), ale některé, převážně starší odrůdy obsahují navíc ve svém karyotypu i 1-10 chromozomových fragmentů. To může být příčinou špatné tvorby semen u některých odrůd.

Jejich stanovištní adaptabilita je ohromná a souvisí zřejmě i s velkým genetickým potenciálem. Obecně jim vyhovuje každá běžná zahradní půda, spíše vlhčí, bohatá na humus a dostatečně osluněné stanoviště či polostín. Plamenky nemají příliš rády vysoké letní teploty spojené s úpalem. V teplejších polohách dávají přednost přistíněným stanovištím i když na plném slunci také po určitou dobu porostou. Pokud plamenkám vyhovuje vybrané místo, vydrží tam bez většího ošetřování po dlouhou dobu. Nepotřebují přihnojování, i když zahradní kompost jim vždy udělá dobře. Po čtyřech až osmi letech na stanovišti je dobré trs brzy na jaře celý vyjmout, rozdělit a opět vysadit (Matiska, 2005).

Okrasné odrůdy *P. paniculata* je nutné množit vegetativně, aby byl zachován jejich charakter, Matiska (2005) proto doporučuje dělení trsů a případně bylinné nebo kořenové

řízky. Další možností je pak množení *in vitro*, které popsali například Declerk and Korban (1995) a Fraga et al. (2004).

Šafránková (2006) uvádí jako nejčastější choroby plamenek hlavně ty houbové jako je padlí *Erysiphe magnicellulata* (syn. *E. cichoracearum*) a *Sphaerotheca fusca* (syn. *S. fuliginea*), askochytové (*Ascochyta phlogis*) a septoriové (*Septoria phlogis*) listové skvrnitosti a *Verticillium albo-atrum* napadající stonky, dále se mohou objevit viry a fytoplasmy. Ze škůdců jsou nejvýznamnější háďátka (*Ditylenchus dipsaci*), které způsobují deformace stonků a lisů a Böhm (1991) zmiňuje, že takto napadené rostliny je třeba vykopat a spálit.

3.1.2 Použité odrůdy

3.1.2.1 'Mt. Fuji'

Anonym [cit. 2017-02-11] a Reiger [cit. 2017-02-11] ji popisují jako velice otužilou a odolnou odrůdu dorůstající výšky 90 - 130 cm. Květenství jsou pyramidální, složená z čistě bílých květů velikosti zhruba 2,5 - 3 cm. Kvetou poměrně dlouho - od července do září. Jedná se o starší plamenku, šlechtitel ani rok vzniku nejsou uvedeny. Matiska (2009) k ní uvádí, že existují domněnky, že by se mohlo jednat o přírodní varietu *P. paniculata* var. *amplifolia* a také zmiňuje její vynikající odolnost a vitalitu. Často se uvádí názvy 'Fujiyama', 'Mt. Fujiyama' nebo 'Mount Fujiyama'.

Obr. 1: odrůda 'Fuji'
Hartmut Rieger [cit. 2017-02-11]



3.1.2.2 'Miss Pepper'

Podle Anonym [cit. 2017-02-11] a Reigera [cit. 2017-02-11] jde o odrůdu vyšlechtěnou G. Bartelsem v roce 1992. Tvoří kompaktní trsy a dorůstá výšky 90 - 120 cm. Květenství jsou výrazně větvená a složená z růžových květů s tmavým červenorůžovým okem, květy dosahují průměru 2 - 2,5 cm. Kvetou v červenci a srpnu.

Z práce Matisky (2009) vyplývá, že obě tyto použité odrůdy vytváří klíčivá semena poměrně dobře a potomstvo je variabilní.

Obecně o kulturách *in vitro*

Základní informace o kulturách rostlinných explantátů v podmínkách *in vitro* byly dostatečně vysvětleny v bakalářské práci - Šašek (2015), na kterou je zde volně navázáno. Tyto teoretické základy zde již nebudou více rozvedeny (teorie totipotence rostlinné buňky, práce ve sterilních podmínkách a nutnost odvození aseptických kultur, popis nezbytného vybavení jako je autokláv nebo flowbox, popiš kultivačních médií a tak dále). Zde jsou již brány jako samozřejmé.

Využití fytohormonů a regulátorů rostlinného růstu

V této části budou více popsány pouze fytohormony a regulátory rostlinného růstu (dále souhrnně označeno jako RRR) použité v praktické části práce a spadající do dvou základních skupin - auxiny a cytokininy. V některých publikacích k explantátovým kulturám byly použity i další, například gibereliny a kyselina abscisová, některé tyto příklady jsou velmi stručně zmíněny na konci kapitoly. Úloha nativních fytohormonů vyskytujících se v donorových rostlinách a explantátech a jejich působení na vývoj a ovlivnění regenerační schopnosti je nezpochybnitelná, v této práci již ale nebyl prostor pro mapování těchto efektů a proto jim není věnována pozornost.

Důležité také je, že auxiny a cytokininy jsou sice odlišné skupiny látek s různými mechanismy účinku, ale velká většina efektů v kulturách *in vitro* je podmíněna použitím jejich přesné kombinace, kromě toho také Gaspar et. al. (1996) upřesňují, že koncentrace

Obr. 2: odrůda 'Miss Pepper'
Hartmut Rieger [cit. 2017-02-11]



a zvolené fytohormony se výrazně liší podle druhu rostliny, kultivačních podmínek, požadované reakce, formy fytohormonů, a podobně. Už Skoog and Miller (1957) pozorovali velmi odlišnou odezvu explantátů na různé poměry auxinu a cytokininu - nadbytek auxinu vedl k růstu kořenů, nadbytek cytokininu k tvorbě prýtlů a vyrovnaná koncentrace způsobila růst nediferencovaného kalusu. Novák (1990) dodává, že toto pravidlo má obecnější platnost hlavně u dvouděložných rostlin, pro jednoděložné je principem organogeneze spíše snížení koncentrace auxinu, respektive jeho vynechání (zvláště pokus jde o vysoce účinné 2,4-D).

Tabulka č.1: Přehled používaných RRR a doporučená rozpouštědla
Bhojwani and Dantu (2013)

Growth Regulator	Abbreviation	M.W.	Solvent
Indole-3-acetic acid	IAA	175.2	Ethanol/1 N NaOH
Indole-3-butyric acid	IBA	203.2	Ethanol/1 N NaOH
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.04	Ethanol/1 N NaOH
α -Naphthalene acetic acid	NAA	186.2	Ethanol/1 N NaOH
Naphthoxyacetic acid	NOA	202.2	1 N NaOH
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.5	Ethanol
para-Chlorophenoxyacetic acid	p-CPA	100.59	Ethanol
4-Amino-3,5,6-trichloro pyridinecarboxylic acid	Picloram	241.5	Acetone
3,6-Dichloro-o-anisic acid	Dicamba	221	Ethanol/Acetone
6-(Furfurylamino)-purine (kinetin)	KIN	215.2	díl HCl/1 N NaOH
6-(Benzylamino)-purine	BAP	225.3	1 N NaOH
2-(Isopentynyl)-adenine	2iP	203.2	1 N NaOH
6-(4-Hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)-purine (Zeatin)	ZEA	219.2	díl HCl/1 NaOH
1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea (thiadiazuron)	TDZ	220.3	DMSO
6-(3-Hydroxybenzylamino)-purine	mT	243.26	1 N NaOH
Gibberellic acid	GA ₃	346.4	Water
Absciscic acid	ABA	264.31	1 N NaOH
Tri-iodo benzoic acid	TIBA	499.81	1 N NaOH
Phloroglucinol	PG	126.11	Ethanol/water

3.1.3 Auxiny

Procházka a kol. (1997) a Beyl (2011) uvádí, že všechny známé látky vykazující auxinovou aktivitu jsou slabé organické kyseliny vyznačující se přítomností indolového nebo aromatického kruhového systému ve specifické vzdálenosti od karboxylové skupiny. Dle Procházků a kol. (1997) a Bhojwani and Dantu (2013) jsou velmi špatně rozpustné ve vodě a pro přípravu zásobních roztoků je tedy nutné je nejdříve rozpustit buď v organickém rozpouštědle nebo ve vodném alkalickém prostředí a následně naředit vodou.

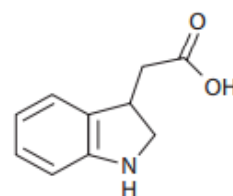
Protože auxiny mají spíše stimulační efekt, přidávají se podle Kováče (1995), Procházky a kol. (1997) a Bhowani and Dantu (2013) do kultivačních médií pro stimulaci dlouhivého růstu buněk, jejich dělení, tvorbu kalusu, diferenciaci a dále indukci organogeneze, somatické embryogeneze a rhizogeneze. K stimulaci zakořeňování řízků se používají i mimo kultury *in vitro* - jako nejvýhodnější pro toto využití uvádí Procházka a kol. (1997) kyselinu α -naftyloxy (NAA) a kyselinu indolyl-3-máselnou (IBA).

3.1.3.1 Kyselina indolyl-3-octová (IAA)

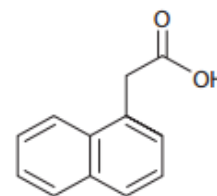
Kováč (1995) a Procházka a kol. (1997) popisují IAA jako nejdéle známý auxin. Je přírodní, její úloha v rostlinách je velice dobře prostudována a v explantátových kulturách je široce využívána i přes to, že je pravděpodobně nejméně stálá a snadno dekarboxyluje. její rozklad je výrazně urychlen světlem a hlavně UV zářením. Proto se doporučuje častěji obnovovat zásobní roztok. Bhowani and Dantu (2013) doporučují pro rozpouštění roztok NaOH nebo ředěný ethanol. Beyl (2011) označuje IAA jako relativně slabý auxin, překonávají ho stálejší syntetické.

U *P. paniculata* použili Jain et al. (2002) $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ IAA v kombinaci s $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP ke stimulaci růstu kalusu a následně v odlišném poměru k zahájení somatické embryogeneze. V následných pokusech se ovšem touto kombinací nezdařilo indukovat ani tvorbu kalusu (Matiska a Vejsadová (2007) a Šašek (2015)) a tento postup se tedy nepodařilo potvrdit. Podle Matisky a Vejsadové (2007) a Matisky (2009) přidání IAA k TDZ u plamenky výrazně zlepšilo organogenezi.

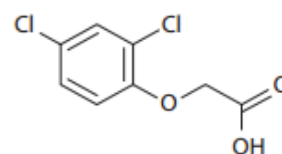
Obr. 3: chemická struktura použitých auxinů
Beyl (2011)



Indole-3-acetic acid (IAA)



1-Naphthaleneacetic acid (NAA)



2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

3.1.3.2 Kyselina α -naftyloctová (NAA)

Procházka a kol. (1997) kyselinu α -naftyloctovou řadí mezi syntetické auxiny spadající do kategorie naftalenových kyselin, chemicko-fyzikální vlastnosti jsou podobné IAA, ale jde o látku stálou. V explantátových kulturách se podle Bhojwani and Dantu (2013) nejčastěji používá pro zakořeňování rostlin nebo jejich částí a v kombinaci s cytokininem pro růst výhonů.

V prašnickové kultuře *P. drummondii* použili NAA v kombinaci s BAP k multiplikaci získaných kalusů Radzan et al. (2008). Fraga et al. (2004) navrhuji vyžití NAA + BAP u *P. paniculata* pro indukci organogeneze z listových explantátů, ale pouze v nízké koncentraci ($0,1 \text{ mg. l}^{-1}$), jelikož vyšší koncentrace ($0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ a více) NAA v médiu má silný inhibiční vliv na tvorbu výhonů. Matiska a Vejsadová (2007) mimo jiné testovali vliv vyšší koncentrace NAA v kombinaci s cytokininem na organogenezi u listových segmentů odrůdy 'Fuji'. NAA měla v tomto pokusu jednoznačně negativní vliv - kombinace 2 mg. l^{-1} NAA s $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ BAP indukovala růst výhonů u necelé desetiny explantátů, varianta s $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ TDZ stimulovala pouze růst drobného kalusu bez následné organogeneze. To odpovídá výsledkům které získal Matiska (2009) - NAA indukuje hlavně růst kalusu a kořenů (rhizogenezi), vliv na organogenezi je negativní.

3.1.3.3 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)

Jedná se o stálý auxin, který spadá mezi chlorfenoxykyseliny (Procházka a kol., 1997). Moore (1979) uvádí, že jde o jeden z prvních selektivních herbicidů sloužících k likvidaci dvouděložných rostlin. V explantátových kulturách je to velice účinný regulátor růstu, Jha and Gosh (2005) ho označují za pravděpodobně nejsilnější běžně používaný auxin. Podle Bhojwani and Dantu (2013) se nejčastěji používá k vyvolání růstu kalusu a nebo k vyvolání somatické embryogeneze. Vhodnost použití pro vyvolání tvorby kalusu je v souladu s tvrzením Procházky a kol. (1998), kteří zmiňují, že 2,4-D často indukuje růst kalusu a to i v kombinaci s cytokininem, která by měla způsobovat odlišnou reakci. Novák (1990) dodává, že 2,4-D je také významným regulátorem používaným u jednoděložných rostlin, které na jeho vyšší dávky dobře reagují. Často také bývá obsažen v iniciačních médiích pro kultivaci prašníků (androgenezi), použili ho například Radzan et al. (2008) u *Phlox drummondii* a Jia et al. (2014) u *Primula forbesii*. Kováč (1995) ovšem dodává, že vysoká koncentrace 2,4-D může vést k potlačení morfogenetické aktivity.

U *P. paniculata* osvědčilo médium obsahující 1-2 mg. l⁻¹ 2,4-D a 0,5 mg. l⁻¹ BAP pro indukci somatické embryogeneze z listových segmentů (Šašek, 2015). Kombinace 2,4-D + BAP odpovídá výsledkům které publikovali Vejsadová a kol. (2016).

3.1.4 Cytokininy

Cytokininy jsou skupinou rostlinných hormonů vyznačující se schopností stimulovat v přítomnosti auxinu buněčné dělení některých rostlinných tkáňových kultur. Vykazují další biologické účinky, z nichž zejména regulace organogeneze a regenerace rostlin má značný význam v biotechnologických aplikacích. Přírozené cytokininy jsou deriváty adeninu substituované v poloze N-6 (Procházka a kol., 1997).

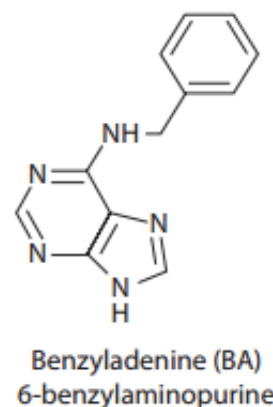
Některé aromatické deriváty močoviny a thiomčoviny jsou vysoce aktivní v biotestech na cytokininy. Nejaktivnější jsou N,N'-difenylmočovina, N-fenyl-N'-pyridylmočovina, tidiazuron a jejich deriváty. Tyto syntetické látky mají podobnou strukturu jako izoprenoidní cytokininy a jsou proto rozeznávány stejnými vazebnými místy (Procházka a kol., 1998). Bhojwani and Dantu (2013) dodávají, že v tkáňových kulturách slouží hlavně ke spuštění dělení buněk, indukci růstu adventivních výhonů z kalusů a orgánů a porušení auxinem způsobené apikální dominance, které vede k prorůstání axilárních pupenů. Pro přípravu kultivačních médií se rozpouští v kyselých a alkalických vodných roztocích nebo dimethylsulfoxidu (DMSO).

3.1.4.1 6-benzylaminopurin (BAP)

Dle Kováče (1995), Procházky a kol. (1997) a Beyl (2011) jde o jeden z nejčastěji používaných cytokininů v explantátových kulturách, hned vedle kinetinu (KIN) a thidiazuronu (TDZ). Kováč (1995) dodává, že se jedná se o stálou přírodní látku rozpustnou v zředěných roztocích HCl a NaOH, což potvrzují Bhojwani and Dantu (2013). Beyl (2011) zmiňuje využití BAP pro stimulaci růstu výhonů a tvorbu kalusu.

Declerk and Korban (1995) zmiňují vhodnost použití velmi nízké koncentrace BAP (0,113 mg. l⁻¹) spolu s IAA k vyvolání organogeneze z listových segmentů plamenky latnaté, jelikož tato kombinace dosahovala největšího zisku výhonů, nemenší tvorby kalusu a nejnižší

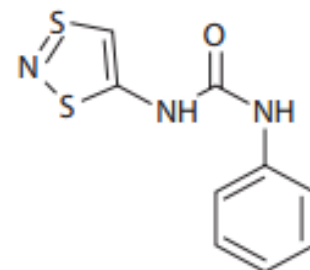
Obr. 4: chemická struktura BAP
Beyl (2011)



hyperhydratace (vitifikace) regenerantů. Vyšší koncentrace BAP byly také testovány a jejich použití sice zdánlivě vedlo k větší tvorbě výhonů, ty ale následně vinou zmíněné hyperhydratace nepokračovaly ve vývoji a nebyly použitelné.

Jak již bylo zmíněno u IAA, Jain et al. (2002) použili u plamenky BAP s IAA ke stimulaci tvorby kalusu a následné somatické embryogenezi. Fraga et al. (2004) dosáhli organogeneze u různých typů explantátů *P. paniculata* při použití samostatného BAP a kombinace BAP + NAA. Tyto poznatky se ovšem částečně neshodují s výsledky které získali Matiska a Vejsadová (2007) a Matiska (2009). V těchto pracích je pozitivní vliv BAP na explantáty plamenky zpochybněn.

Obr. 5: TDZ, Beyl (2011)



Thidiazuron (TDZ)
N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea

3.1.4.2 Thidiazuron (TDZ)

Murthy et al. (1998) popisují TDZ jako substituovanou sloučeninu fenyльмоčoviny, která byla původně vyvinuta pro mechanizovanou sklizeň bavlny, ale v nedávné době se ukázala jako velice účinný regulátor morfogeneze v tkáňových kulturách mnoha druhů rostlin. TDZ vykazuje unikátní cytokininový i auxinový efekt a využívá se pro celou řadu cílů od tvorby kalusu po somatickou embryogenezi. Chemicky neodpovídá auxinům ani purinovým cytokininům a mechanismus účinku zatím není zcela uspokojivě znám.

Declerk and Korban (1995) u plamenky použití TDZ příliš nedoporučují z důvodu přílišného růstu kalusu potlačujícího organogenezi. Ovšem v pokusech, které provedli Matiska a Vejsadová (2007) a Matiska (2009) se TDZ projevil jako nejefektivnější cytokinin jak pro indukci tvorby kalusu tak i pro organogenezi u *P. paniculata*. Při použití samotného TDZ byla pozorována i tvorba somatických embryí. Jeho cytokininový i auxinový efekt byl potvrzen tvorbou kalusů a následnou regenerací i když byl v kultivačním médiu použit samostatně.

3.1.5 Stručný popis a příklady využití dalších fytohormonů

3.1.5.1 Gibereliny

Gibereliny chemicky patří do skupiny terpenů. Všechny gibereliny jsou slabé organické kyseliny; jsou to bílé krystalické látky, špatně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech či mírně alkalických vodných roztocích. Gibereliny jsou látky stabilní; nedoporučuje se je však autoklávovat - do sterilních médií se přidávají přes bakteriální filtr (Procházka a kol., 1997). Dále Procházka a kol. (1997) zmiňují, že gibereliny jsou lipofilního charakteru a řadí se spíše ke stimulačním fytohormonům.

Jha and Gosh (2005) dále uvádí, že je známo asi 90 giberelinů a nejčastější z nich je GA3. V živných médiích nejsou příliš využívány, jejich hlavní účinky v explantátových kulturách jsou stimulace prodloužení výhonů, formování cibulek a hlíz a dozrávání embryí, ale také mohou inhibovat růst kalusu a kořenů.

Gibereliny u plamenky použili například Schnabelrauch and Sink (1979), zkoumali možnosti *in vitro* propagace *P. subulata* a *P. paniculata* s využitím 3 - 5 mm dlouhých explantátů z výhonů. Použili MS médium, vitaminy podle Nitsche, 5 mg. l⁻¹ BAP, 40 mg. l⁻¹ adenin-sulfátu a 3,5 x 10⁻³ mg. l⁻¹ GA3. Zmiňují, že přítomnost GA3 byla esenciální pro prodloužení axilárních pupenů.

3.1.5.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule. Může se vyskytovat ve formě několika izomerů; fyziologicky aktivní je výhradně její (+)-S-izomer. Většina chemických změn v molekule kyseliny abscisové vede ke značné redukci až ztrátě aktivity. Výjimkou jsou epoxysloučeniny s vysokou aktivitou - takovou látkou je xantoxin, přímý prekurzor kyseliny abscisové (Procházka a kol., 1998).

Kováč (1995) a Jha and Gosh (2005) uvádějí, že v *in vitro* kulturách se využívá její inhibiční vliv - používá se k dozrávání somatických embryí, potlačení předčasného klíčení a také k inhibici růstu prýtlů.

Kultivace a regenerace rostlin v podmínkách *in vitro*

Kultivaci rostlin nebo jejich částí (explantátů) v podmínkách *in vitro* je možno pro přehlednost dělit do různých kategorií. Rozdělení vycházející z publikací Procházky a kol. (1997, 1998) nejprve vymezuje zda jde o regeneraci (růst a další vývoj) orgánů, které již byly

založeny na donorové rostlině, nebo o jejich tvorbu *de novo*. Při regeneraci z již založených základů je pouze stimulován jejich vývoj a ve většině případů je také urychlen. Do této kategorie spadá především kultivace meristémů, pupenů a podobně. V tomto případě dochází pouze k intenzivnějšímu prorůstání orgánů, které by dříve či později byly, nebo mohly být, vytvořeny i při běžných podmínkách u daného druhu. V případě regenerace *de novo* musejí jednotlivé buňky nebo celá pletiva explantátu nejdříve projít dediferenciací. Novák (1990) ji popisuje jako proces, při kterém již diferencované buňky revertují zpět do meristemického stavu, tím je nastartován jejich další, více či méně, přirozený růst a vývoj. Tyto buňky následně zpětně diferencují a vytváří nová pletiva a orgány - a to buď přímo (diferenciace přímá) a nebo nepřímou, kdy nejprve vzniká kalus a teprve na něm mohou být regenerovány organizované struktury.

Dle Bhojwani and Dantu (2013) je kalus zvláštním typem parenchymatického pletiva, obsahujícího meristemická centra. Postrádá jakékoliv organizované struktury, ale často bývá v průběhu růstu pozorována postupná lokální diferenciace - většinou vznikají ohraničené tracheální elementy. Kalus je také ve většině případů složen z více typů buněk, tato heterogenita je způsobena nejčastěji jeho původem v mnohobuněčném explantátu, který byl složen z různých typů pletiv a také kultivačními podmínkami. Výsledkem toho je množství různých typů kalusů, které mohou být izolovány i z jediného explantátu. Ty se pak liší konzistencí, barvou, obsahem vody, chemosyntetickým a regeneračním potenciálem a tak dále. Novák (1990) zmiňuje, že se takřka vždy jedná o nestejnorodý systém složený z buněk různého stupně diferenciace a tím pádem s různou morfogenetickou kompetencí a různou reakcí na morfogenní exogenní signál.

Důležitým jevem při *in vitro* regeneraci rostlin *de novo* je somaklonální variabilita, Novák (1990) a Bhojwani and Dantu (2013) ji popisují jako fenotypovou variabilitu vegetativně vzniklých rostlin, které byly regenerovány z explantátů, které prošly dediferenciací. Tyto změny mohou, ale nemusí být dědičné a mají původ v cytologické nestabilitě dediferencovaných buněk a kalusů a v abnormalitách přirozených regulačních mechanismů. Dědičná somatická variabilita má původ v karyologických změnách, strukturních změnách na chromozomech, a podobně, ta nedědičná pak například ve změně na úrovni exprese genů. Matiska (2009) například pozoroval v několika případech somaklonální variabilitu u regenerantů *P. paniculata*, tyto fenotypové odchylky byly ovšem postupem času potlačeny a rostliny se vracely do původní podoby (abnormální výhony postupem času z trsů

úplně vymizely a byly nahrazeny výhony typickými pro danou odrůdu, které obrážely z kořenů). Domnívá se tedy, že plamenka latnatá k tomuto jevu není příliš náchylná.

Procházka (1997,1998) a Novák (1990) uvádí dvě základní cesty vývoje struktur na explantátu *de novo*: organogenezi a somatickou embryogenezi, zvláštním případem je pak regenerace haploidních pletiv, orgánů a ve výsledku celých rostlin v procesu androgeneze a gynogeneze.

Termínem organogeneze může být ovšem označena jakákoliv tvorba a růst orgánů, ať už z existujících základů, nebo základů vzniklých až v průběhu kultivace, tedy *de novo*. V této práci je ovšem vzhledem k přehlednosti a rozdělení pokusů použito členění na regeneraci ze založených základů, organogenezi, somatickou embryogenezi a haploidní kultury (v tomto případě androgenezi).

Významné je také, že rostlinné buňky a explantáty postupem času při kultivaci *in vitro* ztrácí regenerační a morfogenetický potenciál, Gahan and George (2008) uvádí například změnu citlivosti k RRR nebo postupnou změnu regenerovaných orgánů, což vysvětluje změnou genové exprese a/nebo změnou endogenní syntézy fytohormonů.

Gahan and George (2008) také zdůrazňují že regenerační potenciál explantátů ovlivňuje celá řada faktorů - je ovlivněn geneticky (rozdíly nejen mezi druhy ale i mezi odrůdami), vývojovým stadiem explantátu (mladší regenerují lépe), růstovou fází donorové rostliny (různé koncentrace endogenních fytohormonů), typem explantátu (u různých druhů jsou v rámci orgánů různé regenerační potenciály), kultivačními podmínkami (výživa, stresové působení, regulátory rostlinného růstu), a tak dále.

3.1.6 Regenerace ze založených základů

Tyto metody jsou nejstarší a nejjednodušší formou kultivace *in vitro*, často nevyžadují přítomnost RRR v kultivačním médiu a také poskytují geneticky stabilní regenerované rostliny - Novák (1990) to odvozuje absencí dediferenciace v procesu kultivace. Prakticky jediná variabilita regenerantů může tedy souviset s již existující nebo nově vzniklou mutací v meristému explantátu.

V tomto případě jsou tedy nejčastěji používanými explantáty izolované apikální meristémy, nodální segmenty s již založenými pupeny a nebo různě velké části výhonů s pupeny. Dá se tedy označit za modifikované řízkování s větší výtěžností.

Fraga et al. (2004) popsali využití jednonodálních stonkových segmentů pro multiplikaci plamenky (konkrétně odrůd 'Blue Boy', 'Orange Perfection' a 'Starfire'). Jako explantáty byly použity segmenty z horních 7 pater donorových rostlin kultivovaných ve skleníku. Byl testován vliv složení kultivačních médií (MS a K médium + 3 % glukózy) a účinek RRR na míru regenerace, získaný počet výhonů a jejich velikost. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u odrůdy 'Blue Boy' variantou MS médium + 1 mg. l⁻¹ BAP a to 100% regenerace s průměrem 14,7 výhonu na explantát a 4,7 nodu na výhon, následuje 2,5 mg. l⁻¹ BAP se 70% regenerace, průměrem 10,7 výhonu a 4,4 nodů. Dobrých výsledků dosahovala

i varianta bez RRR - 60 % reg. a průměr 9,7 výhonu a 4 nodů. Zbývající dvě odrůdy měly horší množitelský potenciál, u 'Starfire' regenerovalo 100% nodů s průměrem 4,7 výhonu a 3,4 nodů při použití MS + 2,5 mg. l⁻¹ BAP a 80% s průměrem 4,6 výhonu a 5,1 nodu u MS + 2,5 mg. l⁻¹ BAP + 0,05 mg. l⁻¹ NAA. Nejmenší výtěžnost byla pozorována u 'Orange Perfection', zde bylo dosaženo maximální míry regenerace 60% s průměrem 1,7 výhonu a 1,8 nodu u MS + 2,5 mg. l⁻¹ BAP, nejvíce výhonů (průměrně 2,5, ovšem pouze s 1,0 nodu 40% reg.) pak na MS + 5 mg. l⁻¹ BAP + 0,05 mg. l⁻¹ NAA. Přítomnost většího množství NAA (více než 0,1 mg. l⁻¹) byla nevhodná a také použití K média se neosvědčilo - bylo sice dosaženo vyšší míry regenerace, ale počet získaných výhonů výrazně zaostával a autoři také zmiňují horší vitalitu regenerantů a vyšší výskyt aberantních fenotypů.

V této práci bylo také zkoumáno využití explantátů z růstových vrcholů (3 mm), donorové rostliny byly identické. U odrůd 'Blue Boy' a 'Starfire' výsledky nedosahovaly potenciálu nodálních explantátů a lze je tedy považovat za nevhodné. Pouze u 'Orange Perfection' bylo docíleno lepší míry regenerace i počtu výhonů na explantát. V těchto případech bylo dosaženo 100% regenerace a průměru 2,5 výhonu s 2,2 nody při použití MS + 2,5 mg. l⁻¹ BAP a průměru 3 výhonů a 4,7 nodu při MS + 5 mg. l⁻¹ BAP + 0,05 mg. l⁻¹ NAA.

3.1.7 Organogeneze

3.1.7.1 Obecně

Jak již bylo zmíněno na předcházející straně, organogenezí je v tomto užším podání myšlena přímá nebo nepřímá regenerace orgánů z výchozího explantátu *de novo*. Z toho důvodu ji Gahan and George (2008) označují jako adventivní organogenezi, neboť vznikají nové orgány a struktury který dříve nebyly přítomny.

Organogenezi může vzniknout v podstatě jakýkoliv orgán rostliny - kořen, prýtl, list, květ. U těch druhů, kde se orgány tvoří za normálních podmínek, lze navodit i vznik zásobních orgánů - cibulí a hlíz. Ty vznikají *in vitro* buď na bázi regenerovaných prýtlů, nebo bezprostředně na kultivovaném explantátu - segmentu zásobního listu cibule, normálního listu, květenství, někdy i pestíku (Procházka a kol., 1998).

Pro praktické využití mají smysl především dvě z nich a to regenerace prýtlů a kořenů. Gahan and George (2008) je nazývají jako kaulogenezi (prýtl) a rhizogenezi (kořeny). Procházka a kol. (1998) zmiňuje i vhodnost využití cibulek a mikrohlízek, plamenka latnatá ovšem tyto orgány nevytváří.

Bhojwani and Dantu (2013) uvádí, že nejprve buď v kalusu nebo na povrchových buňkách explantátu dojde k vytvoření vaskularizovaných, případně nevaskularizovaných meristematických center označovaných jako meristemoidy. Z těchto adventivních meristemů pak vzniká daný orgán.

Kořenové a stonkové meristemoidy se zakládají v kalusovém pletivu nezávisle. Vzhledem k tomu, že diferenciaci obou struktur vyžaduje rozdílné hormonální složení kultivačního média, zřídka kdy dojde k regeneraci celých rostlin v průběhu jediné subkultury. Obecný model regenerace rostlin *in vitro* v prvním stupni vyžaduje regeneraci prýtlů na cytokininovém médiu a ve druhém stupni jejich zakořenění na auxinovém médiu (Novák, 1990).

Důležitý je také inhibiční efekt vznikajících meristemů a vyvíjejících se orgánů na další vznik podobných struktur v okolí, Gahan and George (2008) o něm zmiňují, že postupně se zvětšováním vzniklého meristému se zvětšuje jejich působení na okolí a postupným odebíráním regenerovaných výhonů lze tento inhibiční efekt omezit a docílit tak kontinuální produkce adventivních výhonů z explantátu nebo kalusu, který by bez tohoto zákroku vytvořil pouze málo regenerantů (jejichž vývoj by podstatně zpomalil nebo zastavil vývoj dalších).

Dále je u organogeneze významný původ regenerantů - Novák (1990) uvádí, že původ meristemoidů a tím i regenerovaných orgánů může vycházet z jediné somatické buňky, ale častější jsou případy diferenciaci z několika prostorově (a zřejmě i funkčně) oddělených komunikujících buněk. To je významné z genetického a šlechtitelského hlediska, protože orgány regenerované z více buněk mohou být chimérické.

Gahan and George (2008) dodávají, že v případě přímé organogeneze je prokazatelně vyšší zastoupení regenerace z jediné buňky, případně z několika dceřiných, u nepřímé je vinou přítomnosti stadia kalusu častější původ ve více různých buňkách.

3.1.7.2 Dosavadní poznatky o organogenezi u *P. paniculata*

Declerk and Korban (1995) vypracovali první studii o indukci organogeneze z listových explantátů *P. paniculata* (odrůdy 'Franz Schubert' a 'Prospero'). V sérii pokusů potvrdili nevhodnost temnotního ošetření explantátů (vede k větší tvorbě kalusu a pomalejší regeneraci) a vyšší regenerační potenciál nejmladších listů. U samotné organogeneze bylo nejvhodnější použití MS média s 20 % sacharózy a poměrně nízkou koncentrací RRR ($0,113 \text{ mg. l}^{-1}$ BAP a $0,08 \text{ mg. l}^{-1}$ IAA). U této varianty bylo dosaženo nejvyššího množství výhonů na explantát, nejvyššího průměrného počtu míst na explantátech kde došlo k organogenezi a zároveň k procentuálně nejnižší tvorbě kalusu a hyperhydrataci explantátů.

Organogenezi u plamenky latnaté se dále zabývali Fraga et al. (2004), kteří testovali tři odrůdy ('Blue Boy', 'Orange Perfection' a 'Starfire') a 2 výchozí typy explantátů - listové segmenty a semeníky. Stejně jako u nodálních segmentů a růstových vrcholů bylo i u listových segmentů testováno kromě MS média také K médium, které se ani zde příliš neosvědčilo a tudíž ho pro *P. paniculata* nelze doporučit. Dalším zajímavým poznatkem byl výrazně lepší regenerační potenciál explantátů ze skleníkových rostlin než z kultur *in vitro* (odrůda 'Blue Boy') a také velmi odlišné výsledky mezi jednotlivými odrůdami. U explantátů ze skleníku odrůdy 'Blue Boy' se jako nejlepší jeví využití MS + 5 mg. l^{-1} BAP + $0,05 \text{ mg. l}^{-1}$ NAA (regenerace 86 %, průměr 13,4 výhonu na explantát a 3,8 nodu na výhon) a MS + 1 mg. l^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg. l}^{-1}$ NAA (reg. pouze 47 %, ale průměr 22,5 výhonu a 5,3 nodu). Varianta MS + 5 mg. l^{-1} BAP + $0,05 \text{ mg. l}^{-1}$ NAA byla nejlepší i u 'Orange Perfection' kde bylo dosaženo 100 % regenerace a průměru 10,8 výhonu a 2,1 nodu. Odrůdu 'Starfire' se žádnou testovanou variantou z listových explantátů nepodařilo regenerovat. Organogeneze u 'Starfire' bylo dosaženo až při použití explantátů ze semeníků (podélně rozříznuté semeníky z otevřených květů) a MS + 1 mg. l^{-1} BAP, regenerace byla 50 % a zisk průměrně 14 výhonů o 3,6 nodech. Semeníky 'Blue Boy' nejlépe reagovali na stejnou variantu s regenerací 66 % a průměrem 2,5 výhonu. 'Orange Perfection' pak dosáhla nejlepšího výsledku s MS + 5 mg. l^{-1} BAP + $0,05 \text{ mg. l}^{-1}$ NAA (29 % reg. s průměrem 3 výhony a 2 nody na výhon).

Matiska a Vejsadová (2007) se zabývali regenerací výhonů z listových segmentů odrůd 'Fuji' a 'Rijnstroom' a vlivem odběru explantátů z rostlin pěstovaných *in vitro* a ve skleníku. V několika pokusech bylo dokázáno, že explantáty z *in vitro* podmínek měly lepší regenerační schopnost, tento poznatek je v rozporu se zjištěním, které publikovali Fraga et al. (2004). Dále byla jednoznačně prokázána vhodnost použití TDZ v kombinaci s IAA, i když

i samotné TDZ vedlo k uspokojivým výsledkům. V případě explantátů z *in vitro* podmínek bylo použitím MS + 1,5 mg. l⁻¹ TDZ + 2 mg. l⁻¹ IAA u 'Fuji' docíleno 100 % regenerace a 90 % explantátů tvořilo výhony (průměrně 5,23 na jeden), kombinace MS + 1,5 mg. l⁻¹ TDZ + 1 mg. l⁻¹ IAA také dosahovala regenerace 100 %, výhony vytvořilo jen 75 %, ale průměrně jich bylo více - 9,67. Tyto dvě varianty byly nejlepší i pro odrůdu 'Rijnstroom', která ale dosahovala regenerace maximálně v 40 - 63,33 %. V případě listů ze skleníku bylo pro obě odrůdy nejlepší MS + 1,5 mg. l⁻¹ TDZ + 0,5 mg. l⁻¹ IAA, u 'Fuji' regenerovalo 100% a také všechny explantáty vytvořily výhony (průměrně 4,44), u 'Rijnstroom' regenerovalo pouze 60 % a 52,60 vytvořilo výhony (průměrně 8,33).

Další pokusy na toto téma publikoval Matiska (2009). Z nich je patrné, že pro organogenezi výhonů je vhodné v médiu (MS) použít samotné TDZ v koncentraci 0,75 - 1,5 mg. l⁻¹ případně kombinaci s 0,5 - 2 mg. l⁻¹ IAA. 0,25 - 0,5 mg. l⁻¹ TDZ indukovalo růst výhonů slaběji, ale také bylo použitelné. Naopak přítomnost samotného NAA nebo jeho kombinace s cytokininem v médiu vyvolávala pouze růst kalusu a organogenezi kořenů (rhizogenezi). Prorůstání výhonů bylo inhibováno. Také pozitivní vliv cytokininu zeatinu nebyl uspokojivě prokázán. V dalším pokusu bylo zkoumáno působení samotného TDZ na organogenezi výhonů odrůdy 'Miss Pepper'. Z výsledků je patrné, že zvyšování koncentrace z 0,25 až na 1,5 mg. l⁻¹ vede k vyšší regeneraci - nad 0,5 mg. l⁻¹ TDZ již byla 100% a 0,75 mg. l⁻¹ a více vyvolalo prorůstání výhonů ve všech případech. Jejich množství stoupalo s koncentrací, například při použití 1,5 mg. l⁻¹ TDZ jich vznikalo 21,7 ± 5,5. Autor také zmiňuje, že použití vyšší koncentrace než 2 mg. l⁻¹ není vhodné, protože dochází k deformacím regenerantů.

V práci zabývající se indukci somatické embryogeneze u plamenky latnaté (Šašek (2015)) bylo v několika pokusných variantách dosaženo organogeneze z listových segmentů odrůdy 'Fuji' s poměrně dobrými výsledky. Největší odezva byla při použití explantátů ze skleníkových rostlin a MS + 5 mg. l⁻¹ BAP + 1,5 mg. l⁻¹ IAA. V tomto případně 100 % explantátů jeví známky regenerace a 96 % z nich regenerovalo výhony, které byly následně úspěšně kultivovány na čistém MS médiu. U listových explantátů z podmínek *in vitro* již výše zmíněné médium nebylo testováno, protože organogeneze nebyla cílem práce. V tomto případě bylo dosaženo organogeneze při použití MS + 1,5 mg. l⁻¹ BAP + 0,5 mg. l⁻¹ IAA (100 % regenerace a 85 % organogeneze). Zajímavé je srovnání s explantáty ze skleníku, kdy bylo při použití této varianty dosaženo také 100% regenerace, ale pouze 11,11 % explantátů

vytvořilo výhony. V průběhu těchto pokusů byla pozorována relativně vysoká míra hyperhydratace regenerantů, která ale bohužel nebyla přesně zaznamenána a více rozvedena.

3.1.8 Somatická embryogeneze

3.1.8.1 Obecně

Somatická embryogeneze je pouze jednou z variant embryogeneze dosažitelných a využívaných v kulturách *in vitro*. Procházka a kol. (1998) popisuje tyto 4:

1. Zygotická embryogeneze - v tomto případě je *in vitro* kultivováno embryo vzniklé přirozenou cestou, tedy opylením. Jedná se starou metodu. Kultivovaná zygota může vzniknout před odběrem explantátu, nebo až po něm v procesu opylení *in vitro*.
2. Gametofytická embryogeneze - jde o získání embryí ze samčího nebo samičího gametofytu, který je haploidní. Vzniklá embrya tedy mohou vyklíčit v haploidy. Jedná se o přímou formu androgeneze a gynogeneze.
3. Somatická embryogeneze - vznik embryí ze somatických buněk explantátu, vysvětleno dále.
4. Somatická polyembryogeneze - jedná se o proces vzniku adventivních somatických embryí na již vznikajících som. embryích. Ve výsledku vede k neustálému množení raných somatických embryí. Vyskytuje se hlavně u jehličnanů.

Při somatické embryogenezi tedy dochází k vývoji embryogenních struktur a embryí ze somatických buněk explantátu, jejichž vývoj musí být k této reakci uměle usměrněn. Podle Procházků a kol. (1998) a Bhojwani and Dantu (2013) k somatické embryogenezi tedy dochází v několika fázích - indukce, vývoj som. embryí, dozrávání a klíčení v nové rostliny. Působením kultivačních podmínek a volbou explantátu je tedy možné změnit klasický vývoj rostlinných buněk, které se stanou embryogenně determinovanými. Hlavním indukčním faktorem je působení auxinů (nejčastěji 2,4-D nebo NAA), embrya samotná nebo celé embryogenní struktury s embryi v post-globulárním stadiu je následně nutné pasážovat na médium s nižší nebo nulovou koncentrací auxinu, případně sníženým osmotickým potenciálem, kde dozrají a vyklíčí v nové rostliny.

Bhojwani and Dantu (2013) uvádí v této části rozdíl oproti zygotické embryogenezi - zygotická embrya jsou již sama o sobě embryogenně kompetentní - obsahují tzv.

preembryogenně determinované buňky (PEDC), somatické buňky musí být stimulovány, tím dojde k vytvoření indukovaných embryogenně determinovaných buněk (IEDC).

K tomu Novák (1990) dodává, že různé orgány různého stáří vykazují odlišnosti a obecně platí, že mladší, aktivně se dělicí pletiva jsou více embryogenně kompetentní a přístupnější k embryogennímu impulsu než plně diferencovaná, mitoticky neaktivní pletiva. Toto pravidlo má obecnou platnost i pro jiné typy regenerace.

Oproti organogenezi je zde hned několik významných rozdílů, Gahan and George (2008) například zdůrazňuje, že z morfologického hlediska se somatická embrya liší tím, že jsou bipolární - mají vrcholovou a kořenovou část a dělohy (u jednoděložných se vyvíjí koleoptile a *scutellum*) a jsou podobná zygotickým embryím. Také nejsou vaskulárně propojená s okolním pletivem explantátu nebo kalusu. Naopak organogenezi vznikající útvary jsou často prokambiem propojeny s mateřským pletivem. Somatická embrya jsou také na rozdíl od výhonů a jiných orgánů snadno oddělitelná od okolí, v suspenzních kulturách se často sama oddělují. Embryogenně determinované buňky se také liší od ostatních buněk explantátu (pletiva) - mají hustou cytoplazmu, velké jádro a obsahují hodně škrobových zrn.

V případě somatické embryogeneze také nevznikají chiméry, což Gahan and George (2008) vysvětluje jednobuněčným původem somatických embryí, zároveň ale připouští možnost vzniku embryí z více buněk, které jsou bezprostředně u sebe a jsou stejně embryogenně kompetentní, takovéto buňky jsou pravděpodobně dceřinými buňkami jedné mateřské.

Stejně tak jako u organogeneze i zde Gahan and George (2008) zdůrazňují, že vznikající zárodky embryí a embryogenní struktury mají inhibiční vliv na další vznik podobných struktur. Ten lze zvrátit odebráním zárodků nebo dělením kalusu na menší díly.

3.1.8.2 Dosavadní poznatky o somatické embryogenezi u *P. paniculata*

Pravděpodobně první pokusy zabývající se indukcí somatické embryogeneze u plamenky latnaté publikovali Jain et al. (2002). V této práci bylo dosaženo nepřímé somatické embryogeneze v několika stupních kultivace na MS médiu. Pro získání kalusu z listových segmentů bylo využito MS médium + 3 % sacharózy s 2 mg. l⁻¹ IAA a 0,5 mg. l⁻¹ BAP, tvorba somatických embryí byla iniciována přenesením kalusů na MS + 3 % sach. s 0,5 mg. l⁻¹ IAA a 1,5 mg. l⁻¹ BAP. Vzniklá embrya byla následně dopěstována na MS poloviční koncentrace s 2 % sacharózy. Po vyklíčení byla přesazena do sterilního substrátu

a aklimatizována ve skleníku. V této práci ovšem není specifikováno zda byl použit botanický druh nebo odrůda a případně která, srovnání s jinými pokusy je tedy problematické.

Matiska a Vejsadová (2007) zaznamenali při pokusech s indukcí organogeneze z listových explantátů 'Fuji' také dva případy somatické embryogeneze. Docházelo k ní při použití MS média se samotným TDZ, při koncentraci $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ TDZ reagovalo 63,6 % explantátů organogenezí a 27,3 % somatickou embryogenezí a při 1 mg. l^{-1} TDZ nastala organogeneze u 81,8 % a somatická embryogeneze u 45,5 %. To je zajímavý výsledek, protože minimálně na nějakých explantátů tedy musely oba tyto děje probíhat současně.

Matiska (2009) se zabýval somatickou embryogenezí u odrůd 'Fuji' a 'Starfire' a tím jak je ovlivněna působením 3 % a 9 % koncentrace sacharózy v kultivačním médiu (MS), v této části pokusu se koncentrace 9 % projevila jako výrazně horší. Nejlepší variantou RRR byla kombinace 1 mg. l^{-1} 2,4-D + $0,2 \text{ mg. l}^{-1}$ BAP, v tomto případě bylo u 'Fuji' dosaženo $90 \pm 24,5$ % regenerace a $46,7 \pm 20,7$ % tvorby embryogenních struktur a u 'Starfire' pak $73,3 \pm 35$ % regenerace a $33,3 \pm 24,2$ % tvorby embr. struktur. Varianta obsahující pouze 1 mg. l^{-1} 2,4-D dosahovala také velmi dobrých výsledků, což potvrzuje klíčovou roli 2,4-D v procesu indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté.

Tato data se velmi dobře shodují s výsledky, které publikovali Vejsadová et al. (2016).

Využití 2,4-D a BAP pro indukci somatické embryogeneze testoval dále Šašek (2015). V těchto pokusech se samotná 2,4-D neosvědčila - somatické embryogeneze sice bylo dosaženo, ale na minimu explantátů. Pro vyvolání tvorby embryogenního kalusu byla srovnatelně využitelná média 2,4-D 1 mg. l^{-1} + BAP $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ a 2,4-D 2 mg. l^{-1} + BAP $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ a úspěšnost dosahovala 100 a 94,94 %. Pro dozrávání a klíčení som. embryí bylo využito 1/2 MS s 2 % sacharózy, zde nastal mezi testovanými variantami rozdíl - embrya pocházející z 2,4-D 2 mg. l^{-1} + BAP $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$ klíčila výrazně lépe a bylo z nich získáno více rostlin. Také bylo zjištěno, že pro úspěšné dopěstování musí být před převodem do substrátu somatické embryo plně vyklíčené v podmínkách *in vitro*.

3.1.9 Androgeneze

3.1.9.1 Obecně

Androgenezí se rozumí regenerace nových orgánů nebo embryí ze samčích mikrospor nebo gametofytu, který je haploidní a vzniklé rostliny jsou tedy haploidy s širokým využitím ve šlechtitelství a výzkumu. Novák (1990) a Procházka a kol. (1998) uvádí, že androgeneze

může být přímá a nepřímá, přímá je někdy také označována jako pylová embryogeneze a je vlastně formou somatické embryogeneze, která byla indukována z mikrospor. U nepřímé dochází nejdříve k růstu kalusu, který pak v závislosti na podmínkách regeneruje formou organogeneze nebo somatické embryogeneze. Zásadní rozdíl mezi nimi zmiňuje Hadziabdic et al. (2011) - při využití prašnickového explantátu může být tvorba kalusu iniciována i z diploidních pletiv prašníku, ve výsledku tak vzniká heterogenní kalus, který může regenerovat v rostliny na různém stupni ploidie, která je pak určována různými cytologickými technikami.

Neumann et al. (2009) uvádějí několik znaků kterými se odlišují haploidní rostliny od klasických diploidních. Patří mezi ně hlavně nižší vzrůst, menší listy s redukováným průměrem a nadměrné množství malých plodů. Haploidní rostliny totiž také mohou tvořit plody, ale nevytváří semena (jsou sterilní) a protože se velikost plodů často odvíjí od množství semen v nich obsažených zůstávají plody malé a zakrnělé. Haploidní rostliny mohou být také deformované, případně mají vývojové vady. Jako příklad uvádí Neumann et al. (2009) deformace u durmanu (*Datura*), kdy byly pozorovány květy srostlé ze tří okvětních lístků místo pěti, případně u tabáku (*Nicotiana*) byl pozorován srůst gynecea a 7-8 prašníků a květy i listy byly fúzovány ze dvou. Přesněji je ploidie rostlin zjišťována počítáním chromozomů v dělivých buňkách kořenové špičky, což publikovali například Zhao et al. (2014), případně měřením velikosti průduchů, pylových zrn a květů, kdy jsou orgány haploidních rostlin proporcčně menší (publikovali Radzan et al. (2008)). Asif (2013) uvádí další využitelné metody jako použití průtokové cytometrie nebo měření chloroplastů.

3.1.9.2 Předpoklady pro úspěšnou indukci androgeneze

Stejně tak jako předcházející metody práce s explantáty i Androgenezi *in vitro* ovlivňuje velké množství faktorů. Pravděpodobně základním určujícím faktorem je vývojové stádium mikrospor a zvolený typ kultivace. Bhojwani and Dantu (2013) rozlišují dva základní způsoby kultivace - využití celých prašníků jako explantátů a kulturu mikrospor/nezralého pylu. Využití celých prašníků je jednodušší a méně náročné na vybavení - celá poupata se vydesinfikují a ve sterilní prostředí jsou z nich vyjmuty prašníky, pokud jsou květy příliš malé je možné kultivovat celé poupata. Před nebo po odběru jsou explantáty vystaveny stresu a kultivace probíhá v první fázi ve tmě. Po několika týdnech se objeví zárodky pylových embryí nebo kalusu a kultura je přesunuta na světlo, kde je často za pozměněných podmínek

dopěstována (embryogeneze x organogeneze). Druhou možností je kultivace izolovaných mikrospor v tekutém živném médiu, které ale musí být komplexnější než pro celé prašníky. Následuje opět vývoj přes pylovou embryogenezi nebo kalus.

Správné vývojové stadium mikrospor je klíčové pro indukci androgenese, je tedy nutné laboratorně stanovit ideální velikost pupat (a tedy prašníků v nich) pro odběr. Novák (1990) popisuje 3 základní etapy vývoje samčího gametofytu *in vivo*:

1. meioze, jejímž důsledkem je tvorba pylových tetrad z mateřské pylové buňky
2. uvolnění mikrospor ze společné kalózové stěny mateřské tetrády
3. vývoj mikrospory v dospělé pylové zrno, charakterizovaný první a u některých druhů i druhou pylovou mitózou.

Hadziabdic et al. (2011) k tomu dodávají, že pro většinu druhů je klíčový odběr prašníků v době kdy je většina mikrospor v jednojaderné fázi. Ale například u tabáku a *Brassica napus* L. bylo dosaženo požadovaného výsledku při kultivaci prašníků ve stadiu právě před, v průběhu a těsně po první pylové mitóze (pozdní jednojaderné až rané dvoujaderné mikrospory). Stadium vývoje mikrospor je určováno barvením prašníků acetokarmínem nebo propionokarmínem a pozorováním ve světelném mikroskopu. Rané jednojaderné mikrospory jsou pouze mírně barvitelné s centrálním jádrem, jak se dále vyvíjejí, zvětšují se a vzniká vakuola, když se blíží k první mitóze, jádro je stlačeno k periférii mikrospory. V tuto chvíli je barvení stále slabé, ale mohou být patrné kondenzované chromozomy. Produktem první mitózy je dvoujaderná mikrospora obsahující velké vegetativní a menší generativní jádro, vegetativní je málo výrazné a těžko barvitelné, ale generativní je malé, husté a výrazné. S věkem barvitelnost stoupá a začínají se objevovat hodně barvitelná škrobová zrna, která překryjí obě jádra.

Další významné faktory ovlivňující androgenezi popisují Procházka a kol. (1998) a Bhojwani and Dantu (2013), jde především o genotyp (existují značné rozdíly i v rámci druhu a jednotlivých odrůd), stresové působení na donorovou rostlinu (například teplotní šok), nebo odebraná pupata/prašníky (centrifugace, teplotní šok,..), složení kultivačních médií (často se uplatňuje osmotické působení vyšších koncentrací sacharózy nebo jiných osmotik), kultivační podmínky (častá je počáteční kultivace ve tmě) a v neposlední řadě působení regulátorů rostlinného růstu. K tomu Procházka a kol. (1998) uvádí, že často je důležitá přítomnost auxinů, ale v jiných případech zase cytokininů. Existují i zprávy a kladném

účinku kyseliny gibberelové a abscisové. Důležité ale je, že přítomnost RRR v kultivačním médiu není nezbytná a tento proces se může obejít bez nich.

3.1.9.3 Využití

Praktické využití získaných haploidů je hlavně tvorba dihaploidních rostlin, které jsou dále využívány ve šlechtitelství a výzkumu. Dle Nováka (1990) a Asif (2013) je podstatou tohoto využití získání 100 % homozygotních jedinců umělým zdvojením haploidní sady chromozomů. Toho je docilováno nejčastěji působením mitotických jedů jako je například kolchicin. Takto je oproti vyšlechtění rekombinantních inbredních linií ušetřeno mnoho generací. Asif (2013) zmiňuje také možnost zvýšení exprese genů a projev jinak nedostupných recesivně kódovaných vlastností. Chloupek (2008) uvádí že takovéto homozygotní rostliny jsou vhodným materiálem pro šlechtění liniových odrůd, i když uvádí i nevýhody jako například nemožnost hodnocení a selekce v průběhu homozygotizace, somaklonální variabilitu, preferenci genotypů, které tento postup lépe snáší a podobně. Neumann et al. (2009) zmiňuje také využití ve šlechtění hybridních odrůd.

Asif (2013) dále uvádí využití v genomice a studiu kvantitativních znaků, protože takto odvozené inbrední linie umožňují jejich velké namnožení beze změny a dlouhodobé pěstování na různých lokalitách, pokusy jsou tedy výborně opakovatelné a umožňují nalezení interakcí mezi geny kvantitativních znaků a vlivy prostředí.

Jako další využití Asif (2013) zmiňuje například mutační šlechtění (efektivní podchycení recesivních mutací) a využití v genových transformacích (opět ukotvení v homozygotním stavu).

3.1.9.4 Prašníková kultura u *Phlox drummondii*

Radzan et al. (2008) získali haploidní rostliny procesem nepřímé androgenese u *P. drummondii*. Nejlepších výsledků dosahoval tento postup: kultivace prašníků s mikrosporami v jednojaderné fázi (pozdější stadia reagovala negativně) byla zahájena na iniciačním MS médiu obsahujícím 9 % sacharózy a 2,21 mg. l⁻¹ 2,4-D + 1,13 mg. l⁻¹ BAP. Tato část probíhala ve tmě. Multiplikace získaných androgenních kalusů (šlo tedy o androgenezi nepřímou) byla nejefektivnější po pasážování na MS médium s 3 % sacharózy, 0,93 mg. l⁻¹ NAA + 2,25 mg. l⁻¹ BAP a světelným režimem 16/8. Organogeneze byla zahájena přesunem multiplikovaných kalusů na MS + 3 % sach. + 1,69 mg. l⁻¹ BAP.

Regenerované výhony byly zakořeny na MS + 1,31 mg. l⁻¹ IAA. Sérií testů bylo zjištěno, že 50 % regenerantů je haploidní, 30 % diploidní a 20 % aneuploidní.

Tato práce je nejbliže druhu *P. paniculata* a částečně slouží jako předloha pokusu č. 5 v praktické části.

3.1.9.5 Další příklady androgeneze

Jia et al. (2014) zkoumali androgenezi u *Primula forbesii*. Pro kultivaci byly zvoleny prašníky s mikrosporami v pozdním jednojaderném až raném dvojjaderném stadiu. Nejlepší varianta pro indukci tvorby kalusu byla MS médium s 3 % sacharózy a 1 mg. l⁻¹ BAP + 0,5 mg. l⁻¹ 2,4 - D, prvních 20 dní probíhala kultivace ve tmě při teplotě 25 ± 1 °C, zbývající čas pak na světle (fotoperioda 14/10) při stejné teplotě. Regenerace výhonů byla indukována na médiu MS + 3 % sach. + 0,2 mg. l⁻¹ BAP + 0,01 mg. l⁻¹ NAA a pro následné zakořeňování bylo nejefektivnější čisté MS bez regulátorů. Ploidie regenerantů byla určena pomocí cytologických metod a průtokové cytometrie a odpovídala 2 % haploidů, 65 % diploidů, 9 % triploidů, 5 % tetraploidů, 2 % hexaploidů a 17 % mixoploidů.

4 Metodika

Použité vybavení

Práce na pokusech probíhala v laboratoři k tomu vybavené. Pro práci s kulturami byl využíván flowbox a sterilizace médií a roztoků byla prováděna pomocí parního autoklávu (standardní sterilizace 20 minut na 121 °C), nástroje a použité sklo byly sterilizovány horkovzdušným sterilizátorem.

K práci byly použity skalpely, pinzety, a další nářadí a laboratorní sklo, k samotné kultivaci byly použity především 85 mm plastové petriho misky a 100 ml erlenmeyerovy baňky. K pozorování vývoje explantátů byla použita binolupa (nejčastěji zvětšení 6,3 x 1, 6,3 x 1,6 a 6,3 x 2,5).

Pracovní plocha a nástroje byly v průběhu práce s kulturami opakovaně ošetřovány lihem, stejně tak jako ruce. Nástroje byly navíc pokaždé několikrát během práce opalovány kahanem.

Použité varianty regulátorů rostlinného růstu a kultivační média

4.1.1 Kultivační média

Jako kultivační médium pro všechny pokusy bylo zvoleno klasické MS médium, které navrhli Murashige and Skoog (1962). Toto médium bylo úspěšně použito ve všech studovaných pracích zabývajících se explantátovými kulturami plamenky a nebyl tedy důvod hledat jiné.

Pro explantáty z listů, kořenů, nodů, kalusů a okvětních lístků bylo využito MS s 3 % sacharózy a pro kultivaci prašníků MS s 9 % sacharózy (podpora androgenese osmotickým stresem). PH bylo upraveno po přidání všech složek na hodnotu 5,7 - 5,8 přidáním 1 M roztoku hydroxidu draselného. V případě potřeby snížit pH pak 1 M kyselinou citrónovou. Protože je čisté MS kyselejší než je požadováno, je snižování pH málo časté a připadá v úvahu pouze po přidání většího množství zásobních roztoků s RRR, které jsou alkalické (vzhledem k potřebě rozpustit RRR ve vodě obsahují malé množství hydroxidu draselného).

V následující tabulce je přesné složení použitého kultivačního média s rozdělením na jednotlivé zásobní roztoky, které byly uchovávány v lednici.

Tabulka č. 2: Složení MS média

Zásobní roztok A:	Navážka na 1 l:
NH ₄ NO ₃	16,5 g
KNO ₃	19,0 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	4,4 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3,7 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
Zásobní roztok B:	Navážka na 1 l:
H ₃ BO ₃	0,62 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O (H ₂ O)	2,23 g (1,69 g)
ZnSO ₄ . 4 H ₂ O (7 H ₂ O)	0,86 g (1,06 g)
Zásobní roztok C:	Navážka na 1 l:
KJ	0,083 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,025 g
Zásobní roztok D:	Navážka na 1 l:
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0025 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0025 g
Zásobní roztok E:	Navážka na 1 l:

Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	3,73 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78 g
Zásobní roztok V:	Navážka na 1 l:
kyselina nikotinová	0,05 g
pyridoxin	0,05 g
thiamin	0,01 g
glycin	0,20 g
Přímá navážka:	
sacharosa	30,0 g
agar	8,0 g
myo-inositol	0,1 g
Na 1 l média pipetovat:	100 ml A
	10 ml B
	10 ml C
	10 ml D
	10 ml E
	10 ml V
pH upravit na 5,7 – 5,8	

Při přípravě média byly postupně v odměrné baňce smíchány jednotlivé zásobní roztoky v uvedeném objemu a pořadí, následovaly přímé navážky a jako poslední roztoky RRR. Je nezbytné upravit pH na optimální úroveň až po přidání těchto roztoků, jelikož obsahují KOH a pH výrazně zvedají. Při přípravě médií do petriho misek se celé hotové médium převede do 1 l erlenmeyerovy baňky a autoklávuje 20 minut na 121 °C. Po ochlazení na pracovní teplotu (zhruba 50 - 60 °C) je pak ve flowboxu rozlito do jednotlivých misek, misky se po ochlazení zabezpečí PE fólií a popíší. V případě přípravy 100 ml baněk a 200 ml skleniček je médium převedeno do 2 l kádinky a rozvařeno v mikrovlnné troubě do plného rozpuštění, následně je médium rozlito do používaných nádob, zabezpečeno hliníkovou fólií, popsáno a autoklávuje opět na 121 °C 20 minut.

4.1.2 Regulátory rostlinného růstu a jejich kombinace

V pokusech bylo použito 5 regulátorů rostlinného růstu: auxiny IAA, NAA a 2,4-D a cytokininy BAP a TDZ. Do médií byly přidávány ve formě roztoků, které byly připraveny rozpuštěním daného množství látky v několika kapkách 1 M KOH a následně dolití destilovanou vodou do požadovaného objemu.

V následující tabulce jsou uvedeny kombinace a koncentrace použitých RRR, pro jednodušší srovnání bylo použito od každého RRR 0,5 a 2 mg. l⁻¹, (až na několik výjimek ve specifických pokusech) stejně tak jako ve všech kombinacích. Kromě těchto kombinací bylo použito také čisté MS médium bez RRR, které v některých pokusech sloužilo jako kontrola a jinde jako plnohodnotná testovací varianta (kořenové segmenty, nodální segmenty,..).

Tabulka č.3: všechny použité varianty v pokusech

Varianta	Regulátor rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)				
	IAA	NAA	2,4-D	BAP	TDZ
1	-	-	-	-	-
2	0,5	-	-	-	-
3	2	-	-	-	-
4	0,5	-	-	2	-
5	2	-	-	0,5	-
6	0,5	-	-	-	2
7	2	-	-	-	0,5
8	-	0,5	-	-	-
9	-	1	-	2	-
10	-	2	-	-	-
11	-	0,5	-	2	-
12	-	2	-	0,5	-
13	-	0,5	-	-	2
14	-	2	-	-	0,5
15	-	-	0,5	-	-
16	-	-	2	-	-
17	-	-	2	1	-
18	-	-	0,5	2	-
19	-	-	2	0,5	-
20	-	-	2	-	1
21	-	-	0,5	-	2
22	-	-	2	-	0,5

23	-	-	-	0,5	-
24	-	-	-	2	-
25	-	-	-	5	-
26	-	-	-	-	0,25
27	-	-	-	-	0,5
28	-	-	-	-	1
29	-	-	-	-	2

Stanovení podmínek kultivace

Pokusy byly prováděny v plastových jednorázových 85 mm petriho miskách, větší explantáty, nebo explantáty kde byl očekáván velký nárůst hmoty byly kultivovány ve 100 ml erlenmeyerových baňkách. Ty byly v některých pokusech nahrazeny malými zavařovacími skleničkami o objemu 200 ml (mají širší hrdlo, což mnohdy usnadňuje manipulaci). Erlenmeyerovy baňky i skleničky byly uzavřeny čtvercem z hliníkové fólie a utěsněny páskem PE fólie, petriho misky pouze PE fólií.

Donorové rostliny pro odběr listových explantátů, prašníků a okvětních lístků byly pěstovány ve skleníku, čímž byla minimalizována kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Květináče s rostlinami byly umístěny do skleníku brzy na jaře před rašením, zde velice rychle obrazily a po dosažení velikosti zhruba 20 cm byl zahájen odběr explantátů. Kultivace *in vitro* probíhala v plně kontrolovaných podmínkách inkubátoru (fotoperioda 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplota 23 °C při osvětlení a 18 °C za tmy, osvětleno lineárními zářivkami cool white) nebo ve stojanu umístěném volně v laboratoři (kontrola fotoperiody 16/8, lineární zářivky cool white, teplotní režim nebyl přesně vymezen - řídil se teplotou v laboratoři, ročním obdobím a výkonem klimatizace, rozmezí teplot tedy bylo 18 - 26 °C). Inkubátor sloužil hlavně pro umístění explantátů v petriho miskách, což odpovídá listovým a kořenovým segmentům, okvětním lístkům a prašníkům (druhá fáze kultivace po iniciaci ve tmě). Nodální segmenty a varianty s probíhající organogenezí a růstem výhonů, část kalusů a již regenerované rostliny byly kultivovány ve 100 ml baňkách nebo 200 ml skleničkách ve stojanu volně v laboratoři.

Specifické kultivační podmínky vyžadoval pouze pokus s androgenezí, kde byla iniciace prašníků provedena ve tmě při teplotě 25 ± 1 °C. Po ukončení této fáze probíhala další kultivace nejdříve v inkubátoru a následně ve stojanu v laboratoři.

Pokus č. 1 - listové segmenty

V první fázi pokusu byla cílem aplikace 23 pokusných variant (žlutě v tabulce č.3) na listové segmenty odrůdy 'Fuji' získané z rostliny kultivované ve skleníku. Byly použity mladé listy z horních částí výhonů (3 vrchní patra, listy které dosáhly zhruba 3/4 velikosti a mladé plně vyvinuté). Následovalo mapování indukovaných reakcí, jejich vyhodnocení a výběr perspektivních variant pro druhou fázi pokusu. Druhá fáze zahrnovala použití vybraných variant na listové segmenty odrůd 'Fuji' a 'Miss Pepper' z rostlin pěstovaných *in vitro* a detailní vyhodnocení.

4.1.3 Desinfekce listů z rostlin kultivovaných ve skleníku

Listy ze skleníkových rostlin odebrané pro přípravu explantátů byly povrchově sterilizovány postupem který stanovil jako vhodný Matiska (2009) a Šašek (2015). Byl použit komerční desinfekční přípravek SAVO (4,7% chlornan sodný, NaClO) rozředěný na 20 % koncentraci (0,94 % NaClO) sterilní destilovanou vodou s několika kapkami smáčedla (tolik aby roztok lehce pěnil). Celé odebrané listy byly ve flowboxu ponořeny na 10 minut do roztoku a následně s maximální opatrností 3x promyty sterilní destilovanou vodou (3 x 15 minut).

4.1.4 První část pokusu- screening

Listy ze skleníkových rostlin jsou poměrně velké, zhruba 5 - 6 cm na délku. Po sterilizaci byla skalpelem z každého listu odstraněna středová žilka a 1 mm okraje a následně byl rozřezán na 4 - 6 explantátů velkých 1 cm². Ty byly po 5 kusech pinzetou umístěny a lehce přitlačeny na médium v petriho miskách. Ty byly zabezpečeny PE fólií a řádně popsány.

Od každé pokusné varianty (tabulka č. 3) a čistého MS byly založeny 4 misky po 5 explantátech. Celkem tedy 23 variant. Pokus probíhal v inkubátoru s fotoperiodou 16/8 a teplotou 18 °C v noci a 23 °C ve dne.

Vyhodnocení bylo provedeno 6 týdnů od založení pokusu, ve všech kategoriích (kalus, kaulogeneze, rhizogeneze, somatická embryogeneze) bylo zvoleno bodové hodnocení. Stupnice hodnocení byla:

- - žádná patrná reakce

+ - velmi slabá reakce, často pouze na některých explantátech

++ - středně silná reakce, většina explantátů

+++ - nejsilnější reakce, všechny, nebo takřka všechny explantáty

Toto bodové hodnocení je využito i u některých dalších pokusů.

Následně byly vybrány perspektivní varianty k detailnějšímu vyhodnocení, u variant kde byla indukována rhizogeneze byly počítány jednotlivé kořeny delší než 5 mm na jeden explantát po 6 týdnech kultivace. V případě kaulogeneze byly počítány výhony bez známek vitifikace delší než 1 cm na explantát. Vyhodnocení proběhlo po 6 a 8 týdnech kultivace. Tyto výhony dále nebyly dopěstovány, ze zkušeností byly považovány za finální výsledek, jelikož takto velké výhony již bez problémů po případném pasážování na MS médium bez RRR pokračují v růstu.

Somatická embryogeneze nebyla v první části detailněji vyhodnocena.

4.1.5 Druhá část pokusu

Ve druhé části byly použity listy odrůd 'Fuji' a 'Miss 'Pepper' z podmínek *in vitro*, tyto lístky jsou již sterilní a odpadá tedy potřeba povrchové sterilizace. Jsou menší (max. 2 - 3 cm) a tak nebyla skalpelem odstraněna žilka, ale pouze okraje a celý list byl několika povrchovými řezy mírně porušen pro lepší kontakt s médiem na misce. Pracovní postup byl jinak shodný jako v první části, jediným rozdílem byla nižší výtěžnost explantátů z listů (max. 2 - 4 na jeden list) a tak bylo nutné použít i vývojově starší listy.

Média byla oproti první fázi zredukována na 4 varianty:

2,4-D 2 mg.l^{-1} + BAP $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$

TDZ 2 mg.l^{-1}

IAA $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + TDZ 2 mg.l^{-1}

2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + TDZ 2 mg.l^{-1}

Od každé varianty bylo připraveno 10 misek po 5 explantátech.

Kultivace probíhala opět v inkubátoru se stejnými kultivačními podmínkami jako v první části pokusu.

První vyhodnocení proběhlo po 8 týdnech od založení, bylo využito stejné bodové stupnice jako v první části. Po prvním vyhodnocení byly kalusy pasážovány po 2 až 3 kusech na čisté MS ve 100 ml erlenmeyerových baňkách a umístěny do regálu v laboratoři (fotoperioda 16/8 a ne příliš stálý teplotní režim 18 - 16°C). Druhé a detailnější vyhodnocení proběhlo po 8 týdnech od pasážování, byly počítány výhony delší než 1 cm bez známek

vitifikace a kalusy byly také váženy. K detailnímu vyhodnocení výsledků byla použita statistika.

Varianta indukující somatickou embryogenezi byla ponechána v regálu k delší kultivaci a po 12 týdnech byla vyhodnocena.

Pokus č. 2 - kořenové segmenty

Tento pokus probíhal podle stejného vzorce jako pokus č.1 s listovými segmenty. V první fázi bylo testováno 23 variant (žlutě zvýrazněné v tabulce č.3) na odrůdě 'Fuji', ve druhé pak 4 vybrané na obou odrůdách. Kořenové explantáty pocházely v první i druhé části z rostlin kultivovaných *in vitro*, protože bylo předpokládáno, že kořeny z rostlin pěstovaných v půdním substrátu by nebylo možno vydesinfikovat a navíc by došlo k poškození donorových rostlin, které sloužily k odběrům pro další pokusy. Zvolené odrůdy *P. paniculata* ovšem v podmínkách *in vitro* velice dobře zakořeňují a nevyžadují k tomu přísady auxinů do pěstebního média, bylo tedy možné získat dostatečné množství kořenů, které nebyly ovlivněny předchozím působením RRR. Výhony odrůdy 'Fuji' bezproblémově zakořeňují maximálně do 6 týdnů od pasážování, u 'Miss Pepper' je zakořeňování mírně slabší, ale stále vysoce úspěšné a dostačující. Vzhledem k neustálému udržování a pasážování těchto odrůd tedy nebyl problém získat dostatek kořenů.

4.1.6 První část pokusu - screening

Kořeny z *in vitro* podmínek byly získány z rostlin pěstovaných na čistém MS médiu bez RRR ve 100 ml erlenmeyerových baňkách. Při přípravě pokusů byly celé rostliny ve flowboxu vyjmuty z baňky, na velké petriho misce rozřezány skalpelem na jednotlivé části a kořeny byly pinzetou přeneseny do kádinky se sterilní destilovanou vodou, kde z nich byl omyt zbytek média. Následně byly kořeny rozřezány na 1 cm dlouhé segmenty, které byly po 5 umístěny na petriho misky a mírně zatlačeny do média. Po té byly misky zabezpečeny PE fólií a popsány. Jako explantáty byly použity pouze silnější kořeny o tloušťce přibližně 2 mm.

Od každé varianty (celkem 23 variant) byly založeny 4 misky po 5 kořenových segmentech.

Kultivace probíhala v inkubátoru s fotoperiodou 16/8 a teplotou 18 °C v noci a 23 °C ve dne.

Po 8 týdnech od založení bylo provedeno první vyhodnocení všech variant a jejich třídění na perspektivní a neperspektivní, které byly vyřazeny. V této části bylo opět použito

bodové hodnocení z první části pokusu s listy. Detailněji byla vyhodnocena kaulogeneze a somatická embryogeneze. Také zde byly vybrány varianty tvořící žlutý rozpadavý kalus, které byly použity v pokusu č. 3.

Varianty kde docházelo k kaulogenezi byly vyhodnoceny pomocí procent, aritmetických průměrů a směrodatných odchylek. Následně byly explantáty tvořící výhony pasážovány do 100 ml erlenmeyerových baněk s čistým MS. Po 5 týdnech od pasážování byly spočítány zdravé výhony nejevící známky vitifikace.

Somatická embryogeneze byla vyhodnocena po 12 týdnech kultivace pomocí orientační stupnice usnadňující obtížné počítání embryí. Bylo tak rozlišeno pouze zda na explantátu embrya nejsou (0), je jich 1 - 10 (1) a je jich více než 11 (2). Výsledné hodnoty byly zpracovány formou průměrů a směrodatných odchylek.

4.1.7 Druhá část pokusu

V této části byly vybrány 4 varianty z první části pokusu které byly založeny ve větším množství (postup a kultivační podmínky stejné). Od každé varianty bylo založeno 10 misek po 5 explantátech a byly použity obě odrůdy.

Použité varianty:

MS

BAP $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$

2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + BAP 2 mg.l^{-1}

2,4-D $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ + TDZ 2 mg.l^{-1}

Varianty u kterých došlo ke kaulogenezi byly tentokrát na kultivačním médiu ponechány déle (10 týdnů) a před následným pasážováním byly obrážející explantáty skalpelem rozděleny na jednotlivé výhony. Celkové vyhodnocení proběhlo 5 týdnů po pasážování. Pokus byl hodnocen hlavně pomocí procent a celkových počtů výhonů.

Zahrnuté varianty:

MS

BAP $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$

V případě embryogenních variant bylo použito stejného hodnocení jako v první části pokusu s rozdílem, že zde bylo od každé varianty 50 explantátů.

Pokus č. 3 - kalusy

V tomto pokusu byla testována možnost navození regenerace výhonů u kalusů vzniklých z listových nebo kořenových segmentů, které na iniciačním médiu nejevily známky diferenciací. Kalusy byly tedy pasážovány na 3 média - čisté MS a 2 varianty RRR - TDZ 0,5 mg.l⁻¹ a TDZ 2 mg.l⁻¹. Z důvodu velikosti kalusů a očekávanému růstu výhonů byla zvolena kultivace ve 100 ml erlenmeyerových baňkách, na jednu vyšly podle velikosti 2 až 3 kalusy. Po 6 týdnech kultivace byly spočítány výhony delší než 1 cm na explantát a následovalo další pasážování již pouze na jedno médium - čisté MS. Po dalších 6 týdnech byly opět počítány výhony delší než 1 cm na explantát. Kultivace probíhala v regálu v laboratoři (fotoperioda 16/8, teplotní rozmezí 18 - 26 °C).

První část zahrnovala pevné zelené vitálně rostoucí kalusy získané z listových segmentů a iniciované na následujících kombinacích RRR (kalusy pocházely z první části pokusu č.1, odrůda 'Fuji'):

NAA 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ (24 kalusů)

2,4-D 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ (22 kalusů)

2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹ (18 kalusů)

V této části byly hodnoty rozděleny do 3 skupin podle výchozích variant a následně vyhodnoceny statisticky.

Ve druhé části byly použity kalusy z kořenových segmentů, které vykazovaly pouze slabý růst, byly světle žluté a rozpadavé (kalusy pocházely z první části druhého pokusu, odrůda 'Fuji'). Tyto kalusy byly získány na:

NAA 0,5 mg.l⁻¹

NAA 2 mg.l⁻¹

2,4-D 0,5 mg.l⁻¹

2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹

NAA 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹

V případě těchto žlutých rozpadavých kalusů nebyla po 6 týdnech od pasážování patrná žádná požadovaná změna, kalusy pouze hnědly a nerostly, varianty s nimi byly tedy ukončeny bez detailního vyhodnocení

Pokus č. 4 - nodální segmenty

Cílem tohoto pokusu bylo docílit zesíleného prorůstání axilárních pupenů na explantátech z jednonodálních segmentů. Donorové rostliny odrůd 'Fuji' a 'Miss Pepper' pocházely z podmínek *in vitro*. Vzhledem k velkému množství potřebných explantátů byly použity nodální segmenty ze skoro celých zdrojových rostlin - zhruba 6 pater od vrcholu.

Rostliny byly ve flowboxu vyjmuty ze 100 ml erlenmeyerových baněk a na velké petriho misce sterilním skalpelem rozřezány na jednotlivé nodální segmenty. Listy byly zkráceny na 1/3 aby nedocházelo jejich pokroucením k vytažení explantátu z kultivačního média. Takto upravené explantáty byly po 4 ks zapíchnuty do připravených médií ve 100 ml erlenmeyerových baňkách, které byly uzavřeny čtvercem hliníkové fólie, utěsněny páskou PE fólie a popsány. Od každé varianty bylo založeno 10 erlen. baněk (celkem tedy 40 explantátů). Kultivace probíhala v regálu v laboratoři (fotoperioda 16/8, teplotní rozmezí 18 - 26 °C).

V tomto pokusu byla testována tato média (základem je MS + 3 % sacharózy):

MS

BAP 2 mg.l⁻¹

BAP 5 mg.l⁻¹

TDZ 0,25 mg.l⁻¹

Vyhodnocení úspěšnosti následovalo po 7 týdnech od založení pokusu, kdy byly spočítány výhony větší než 1 cm bez viditelných známek vitifikace. Získané výhony byly odděleny skalpelem od původních explantátů a pasážovány do nových 100 ml erlen. baněk s čistým MS, po 8 týdnech byla pak vyhodnocena úspěšnost převodu a zakořeňování takto získaných rostlinek.

Výsledky byly zpracovány statisticky a formou průměrů a směrodatných odchylek.

Pokus č. 5 - okvětní lístky

V pokusu č.5 byly použity jako výchozí explantáty okvětní lístky odrůdy 'Miss Pepper' pěstované ve skleníku. Cílem bylo docílit na nich tvorby kalusu a následně organogeneze nebo somatické embryogeneze. Květy byly odebrány ráno (mezi 08:30 a 09:00 hod.) a použity byly pouze čerstvě rozvinuté, bez známek poškození.

4.1.8 Desinfekce okvětních lístků

Byly zvoleny 4 varianty sterilizace - 10 a 20 % SAVO + smáčedlo (0,47% a 0,94% NaClO) působící 10 a 20 minut. Postup byl stejný jako u listů, květy přenesené v destilované vodě byly 10 nebo 20 minut s občasným krouživým mícháním máčeny ve zvoleném roztoku přípravku SAVO se smáčedlem a následně 3x promyty sterilní destilovanou vodou (3x 15 minut). Sterilní okvětní lístky byly pasážovány po 5 ks (odpovídá jednomu květu) na petriho misky s kultivačním médiem (4 misky na variantu, celkem 20 explantátů na variantu). Kultivace probíhala v inkubátoru (fotoperioda 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplota 23 °C při osvětlení a 18 °C za tmy).

Jako testovací varianty úspěšnosti sterilizace byla použita následující média:

2,4-D 2 mg.l⁻¹

BAP 2 mg.l⁻¹

TDZ 0,5 mg.l⁻¹

2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹

IAA 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹

IAA 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹

IAA 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹

NAA 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹

Vzhledem k nulové odezvě explantátů a následnému odumření během následujících dvou týdnů byl pokus ukončen.

Pokus č. 6 - nezralé prašníky, androgeneze

4.1.9 Stanovení optimální zralosti prašníků a velikosti poupat pro odběr

Optimální velikost poupat pro odběry byla stanovena pozorováním ve světelném mikroskopu. Nejprve byla odebrána poupata různých velikostí (od 2 mm do 10 mm), ta byla pro přesun a manipulaci uložena do kádinky s destilovanou vodou aby nedocházelo k vysychání. V laboratoři byly pomocí jehel z každého poupěte vypreparovány prašníky, 1 - 2 prašníky posloužily jako preparát. Ten musí být pro lepší rozlišitelnost struktur barven - v tomto případě byl využit acetokarmín. Preparát byl připraven přidáním kapky

acetokarmínu k prašníkům na podložním sklíčku, následným zahřátím nad kahanem a ponecháním 1 minutu v klidu. Poté byly obarvené prašníky překryty krycím sklíčkem a lehce roztlačeny, přebytečné barvivo bylo odsáto buničinou.

4.1.10 Odběr a desinfekce prašníků

Pro desinfekci prašníků byly zvoleny 2 pokusné varianty. Prašníky byly nejprve v obou případech máčeny v 70 % etanolu po dobu 20 vteřin. Následně bylo testováno působení 10% a 20% roztoku přípravku SAVO (odpovídá 0,47% a 0,94% roztoku NaClO) po dobu 10 minut. Po té byla poupata 3x promyta sterilní destilovanou vodou. Práce probíhala ve flowboxu.

Prašníky pro pokus byly vždy odebírány ráno mezi 8 a 9 hodinou a přenášeny v kádince s destilovanou vodou.

4.1.11 Indukce tvorby kalusu a následná multiplikace

První fází kultivace prašnickových explantátů byla indukce tvorby kalusů, které následně po pasážování na další média mohly regenerovat. Z desinfikovaných poupat odrůdy 'Miss Pepper' byly ve flowboxu pomocí jehel vypreparovány prašníky (1 poupě jich obsahuje 5), které byly po jednom jehlou přeneseny na petriho misky s kultivačním médiem. Médium bylo před samotným pasážováním sterilní jehlou lehce rozrušeno - do takto vzniklých jamek byly umístěny prašníky. Na každou misku byla použita 2 poupata, tedy celkem 10 prašnickových explantátů. Na rozdíl od ostatních pokusů bylo zde v indukčních médiích použito 9 % sacharózy (jinde jsou to pouze 3 %).

Kultivace probíhala prvních 10 týdnů v úplné tmě a teplotě 25 ± 1 °C. Po uplynutí této doby byly misky přeneseny do inkubátoru s fotoperiodou 16/8 a teplotním režimem 23 °C ve dne a 18 °C v noci. Zde byly kalusy dále pěstovány 4 týdny.

Indukce tvorby kalusu byla testována na těchto médiích (základem všech je MS + 9 % sacharózy):

čisté MS + 9 % sacharózy

2,4-D 2 mg.l^{-1}

BAP 1 mg.l^{-1}

TDZ 1 mg.l^{-1}

2,4-D 2 mg.l^{-1} + BAP 1 mg.l^{-1}

2,4-D 2 mg.l^{-1} + TDZ 1 mg.l^{-1}

Kalusy z prašníků byly následně pasážovány na multiplikační médium o jiném složení RRR a obsahu sacharózy 3 %, tato média byla již vzhledem k růstu kalusů připravena do 100 ml erlenmeyerových baněk. Celkem byla testována 3 multiplikační média mezi která byly získané kalusy co nejrovnoměrněji rozděleny. Tato fáze pokusu, spolu s regenerací výhonů z kalusů, již probíhala v regálu bez plně kontrolovaných podmínek (popsáno fotoperioda 16/8, teplota 18 - 26 °C). Na těchto médiích byly kalusy kultivovány 10 týdnů. Regenerace výhonů na takto narostlých kalusech je popsána v dalším kroku.

Použitá multiplikační média:

TDZ 2 mg.l⁻¹ + IAA 0,5 mg.l⁻¹

TDZ 2 mg.l⁻¹ + 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹

BAP 2 mg.l⁻¹ + NAA 1 mg.l⁻¹

4.1.12 Regenerace výhonů

Regenerace výhonů probíhala nejdříve na MS médiu obsahujícím IAA 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ (cílem bylo médium s nižší koncentrací TDZ) po vytvoření základů výhonů byly kalusy pasážovány na čisté MS v erlenmeyerových baňkách. Postupně vznikající výhony byly od kalusů oddělovány a pasážovány do samostatných baněk na čisté MS. Zde je problematické uvádět časové rozpětí, protože kalusy reagovaly individuálně a tak k nim bylo také přistupováno.

4.1.13 Testování ploidie regenerantů - průtoková cytometrie

Regenerované rostliny musely být testovány - pro spolehlivost testů byla zvolena průtoková cytometrie. Vzhledem k malému množství rostlin, které stihly zregenerovat, byly měřeny i kalusy - pro toto měření byly vybrány kalusy, které znatelně rostly a bylo předpokládáno, že by z nich také mohly být v blízké době získány výhony.

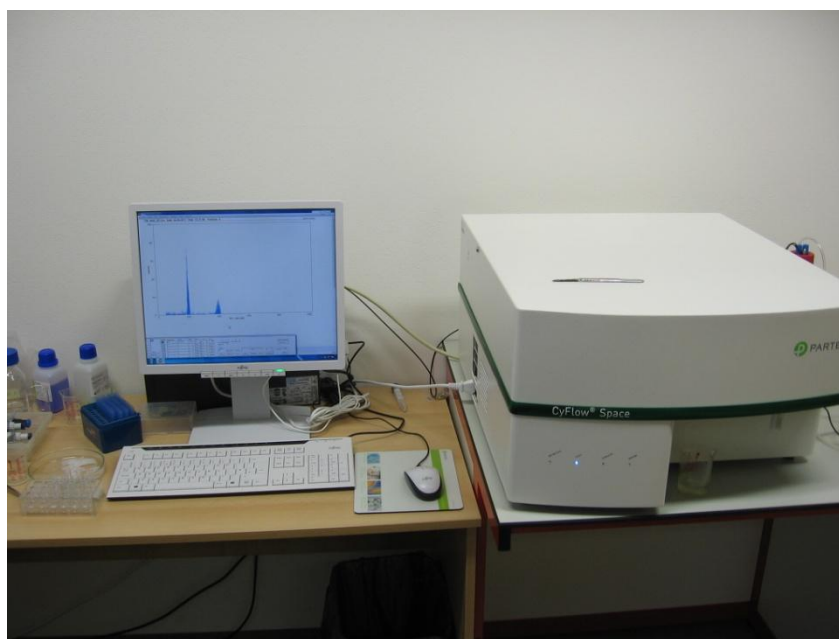
Jako kontrola při měření posloužily dva vzorky - diploidní odrůda 'Fuji' a její tetraploidní forma. Pokusný materiál sice pocházel z odrůdy 'Miss Pepper', ale bylo předpokládáno, že se v tomto ohledu 'Fuji' a 'Miss Pepper' neliší, protože se jedná o velice podobné odrůdy v rámci jednoho druhu a u 'Fuji' byla k dispozici 2n i 4n forma.

Měření bylo prováděno na průtokovém cytometru CyFlow Space, k barvení jader buněk vzorků bylo použito fluorescenční barvivo DAPI. V případě testování výhonů byl

vzorek připraven z 1 - 4 lístků a z kalusů byl použit zhruba 0,5 - 1 cm velký kus (u výhonů i kalusů bylo nutné zachovat část v kultuře pro případné dopěstování). Proměřeno bylo 1600 - 2500 jader každého vzorku.

Testovací vzorek byl připraven nasekáním listu/kalusu v 1 ml OTO1, čímž došlo k uvolnění jader z buněk a přefiltrováním vzniklého roztoku do zkumavky přes mikrofiltr. K této směsi se pipetuje 1 ml OTO2 s DAPI a po minutě se nechá proměřit.

Obr. 6: Průtokový cytometr použitý při vyhodnocování



Metodika zpracování výsledků

Pokusy byly vyhodnocovány použitím procent, aritmetických průměrů a směrodatných odchylek. Detailní vyhodnocení některých pokusů bylo provedeno statisticky s využitím programu Statistica 12. V případě těchto testů byla použita jednotná hladina významnosti 5 %, tedy $\alpha = 0,05$. Normalita dat byla testována pomocí Shapiro-Wilkova testu a pro určení homogenity rozptylů byl využit Leveneův test. Pokud byly tyto předpoklady splněny byla použita jednofaktorová ANOVA a Dunncanův test. Tyto předpoklady ale většinou splněny nebyly a tak byla pro detailní vyhodnocení využita neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA a Spearmannův test pořadové korelace.

5 Výsledky

Pokus č. 1 - listové segmenty

5.1.1 První část - screening

V následující tabulce (tabulka č. 4) jsou souhrnně uvedeny výsledky z prvního vyhodnocení po 6 týdnech kultivace. Je zde jasně patrné rozdělení na varianty indukující růst výhonů (kaulogenezi), růst kořenů (rhizogenezi), tvorbu embryogenního kalusu s patrným zakládáním somatických embryí a růst nediferencujícího kalusu. Tyto cesty regenerace se nepřekrývají a umožňují snadné rozdělení do skupin.

V poznámkách jsou stručně uvedeny charakteristické znaky každé varianty.

Vysvětlivky:

oranžová - varianty tvořící výhony

modrá - varianty tvořící kořeny

zelená - tvorba somatických embryí

žlutá - tvorba kalusů, na kterých nedocházelo k diferenciaci a byly použity v pokusu s kalusy (pokus č.3)

Hlavní důraz byl kladen na vyhodnocení variant kde docházelo ke kaulogenezi a měly tedy největší praktické využití, dále byla detailněji vyhodnocena rhizogeneze. Somatická embryogeneze byla podrobněji řešena až ve druhé fázi tohoto pokusu.

Tabulka č. 4 - hromadné vyhodnocení listových explantátů po 6 týdnech kultivace

Var.	IAA mg. l ⁻¹	NAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	počet ex.	regenerace %	kalus	kaulogeneze	rhizogeneze	som. em.	poznámky
1	-	-	-	-	-	20	0	-	-	-	-	Odumření bez reakce
2	0,5	-	-	-	-	20	0	-	-	-	-	Odumření bez reakce
3	2	-	-	-	-	20	0	-	-	-	-	Odumření bez reakce
4	0,5	-	-	2	-	10	40	+	+	-	-	Deformace, minimální kaulogeneze
5	2	-	-	0,5	-	15	20	+	-	-	-	Deformace, odumření
6	0,5	-	-	-	2	20	100	+++	+++	-	-	Výrazný růst kalusu a kaulogeneze
7	2	-	-	-	0,5	20	100	+++	+++	-	-	Výrazný růst kalusu a kaulogeneze
8	-	0,5	-	-	-	15	80	+	-	+++	-	Růst dlouhých kořenů
9	-	2	-	-	-	10	100	++	-	++	-	Růst kratších kořenů, větší tvorba kalusu
10	-	0,5	-	2	-	20	100	++	-	++	-	Růst kratších kořenů, větší tvorba kalusu
11	-	2	-	0,5	-	20	100	+++	-	++	-	Růst kratších kořenů, větší tvorba kalusu
12	-	0,5	-	-	2	20	100	+++	++	-	-	Výrazný růst kalusu a slabší kaulogeneze
13	-	2	-	-	0,5	20	100	+++	-	-	-	Výrazný růst kalusu
14	-	-	0,5	-	-	20	60	+	-	-	+	Slabá tvorba kalusu, náznak tvorby som. embryí
15	-	-	2	-	-	20	100	++	-	-	++	Embryogenní kalus, náznak tvorby som. embryí
16	-	-	0,5	2	-	20	100	++	-	-	++	Embryogenní kalus, náznak tvorby som. embryí

Var.	IAA mg. l ⁻¹	NAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	počet ex.	regenerace %	kalus	kaulogeneze	rhizogeneze	som. em.	poznámky
17	-	-	2	0,5	-	20	100	++	-	-	++	Embryogenní kalus, náznak tvorby som. embryí
18	-	-	0,5	-	2	20	100	+++	-	-	-	Výrazný růst kalusu
19	-	-	2	-	0,5	15	100	+++	-	-	-	Výrazný růst kalusu
20	-	-	-	0,5	-	20	0	-	-	-	-	Odumření bez reakce
21	-	-	-	2	-	20	5	+	+	-	-	Deformace, 1 explantát vytvořil výhon
22	-	-	-	-	0,5	20	100	+++	+++	-	-	Výrazný růst kalusu a kaulogeneze
23	-	-	-	-	2	15	100	+++	+++	-	-	Výrazný růst kalusu a kaulogeneze

Vyhodnocení rhizogeneze je v tabulce č.5 , vzhledem k tomu, že tento typ regenerace listových explantátů nebyl považován za významný, je pro vyhodnocení využito pouze průměrů a směrodatných odchylek. Kritériem hodnocení byl počet kořenů delších než 5 mm na jeden explantát. Žádné známky vitifikace, která komplikuje vyhodnocování získaných výhonů, u kořenů nebyly pozorovány. Vznikající kořeny byly jednotné, vytvářely kořenové vlášení a nejevily žádné významné rozdíly oproti kořenům, které se tvoří například při zakořeňování výhonů.

Tabulka č. 5: rhizogeneze listových explantátů ze skleníku, 'Fuji'

Var.	NAA mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	Regenerace %	Kalus	Průměrný počet kořenů delších než 5 mm na jeden explantát ± SD po 6 týdnech kultivace
8	0,5		80	+	5,267 ± 3,712
9	2		100	++	2,8 ± 3,327
10	0,5	2	100	++	3,2 ± 2,546
11	2	0,5	100	+++	0,4 ± 0,671

Obr. 7: rhizogeneze



Z těchto výsledků je zřejmé, že NAA má rozhodující vliv na indukci rhizogeneze, ovšem jeho vyšší koncentrace v médiu (zde 2 mg. l⁻¹) má na rhizogenezi negativní vliv a posiluje tvorbu kalusu.

Variety u kterých byla indukována somatická embryogeneze byly v první

části pokusu vyhodnoceny pouze bodově (tabulka č.4).

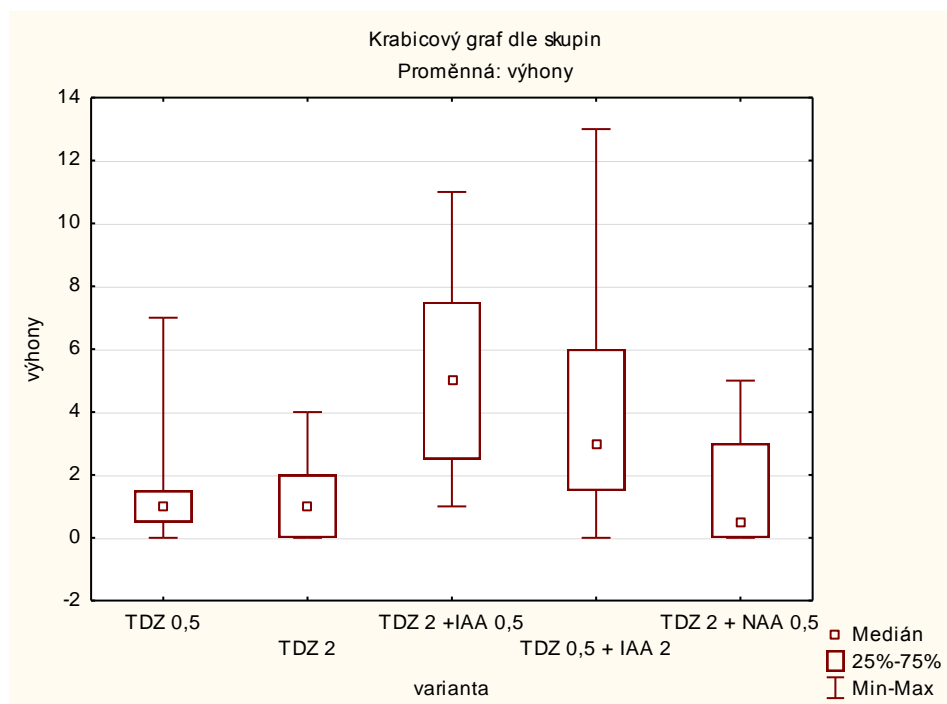
Kaulogeneze (prorůstání výhonů) byla hodnocena dvakrát - po 6 a 8 týdnech od založení. První hodnocení bylo pouze bodové a je v tabulce č. 4, vyhodnocení po 8 týdnech je zpracováno statisticky. Počítány byly výhony bez známek vitifikace delší než 1 cm. (nejdelší dosahovaly maximálně 1,5 cm, průměrná délka se pohybovala pouze kolem 1 cm). Tyto kalusy dále již nebyly pasážovány.

Vzhledem k tomu, že nebyly naplněny předpoklady použití ANOVy, byla pro vyhodnocení použita Kruskal-Wallisova neparametrická ANOVA. Testem bylo zjištěno, že některé varianty se od sebe statisticky odlišují, tento poznatek je dobře patrný z (grafu č.1). Z detailního vyhodnocení vyplývá, že dvě nejlepší varianty (IAA 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ a IAA 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹) se od sebe statisticky neliší a zároveň jsou obě statisticky významně odlišné od variant TDZ 0,5 mg.l⁻¹ a TDZ 2 mg.l⁻¹, které jsou vzájemně statisticky srovnatelné.

V následující tabulce je uveden průměrný počet výhonů na explantát a variantu ± SD. Z vícenásobného porovnávání a grafu je odvozeno rozdělení do skupin.

Tabulka č. 6: vyhodnocení kaulogeneze, listové explantáty ze skleníku, 'Fuji'

Varianta	Průměrný počet výhonů na explantát ± SD	Odvozené rozdělení do skupin
TDZ 0,5 mg.l ⁻¹	1,45 ± 1,761	A
TDZ 2 mg.l ⁻¹	1,133 ± 1,125	A
IAA 0,5 mg.l ⁻¹ + TDZ 2 mg.l ⁻¹	5,4 ± 3,299	C
IAA 2 mg.l ⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l ⁻¹	4,15 ± 3,407	BC
NAA 0,5 mg.l ⁻¹ + TDZ 2 mg.l ⁻¹	1,4 ± 1,776	AB



Graf č. 1: grafické znázornění rozložení jednotlivých variant RRR

5.1.2 Druhá část

Tabulka č. 7: předběžné vyhodnocení, druhá část - listové explantáty z *in vitro*, 'Miss Pepper'

Var.	IAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace (%)	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	poznámky
23				2	50	96	+++	+++	-	-	Tmavě zelené pevné kalusy s prorůstajícími výhony
6	0,5			2	50	100	+++	+++	-	-	Tmavě zelené pevné kalusy s prorůstajícími výhony
18		0,5		2	40	100	+++	+	-	-	Velmi kompaktní pevné kalusy, prorůstání výhonů minimální
17		2	0,5		50	40	+	-	-	+	Žlutohnědé špatně vypadající kalusy, část odumřelá, som. embryogeneze minimální

Tabulka č. 8: předběžné vyhodnocení, druhá část - listové explantáty z *in vitro*, 'Fuji'

Var.	IAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace %	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	poznámky
23				2	50	100	+++	+++	-	-	Velké světleji zelené pevné kalusy s prorůstajícími výhony
6	0,5			2	50	100	+++	+++	-	-	Velmi velké světleji zelené kalusy, Výrazná tvorba výhonů
18		0,5		2	50	100	+++	+	-	-	Velmi kompaktní světlejší kalusy, prorůstání výhonů minimální
17		2	0,5		50	100	++	-	-	+++	Žlutozelené světlé kalusy s viditelnými som. embryi na různém stupni vývoje

Jak je patrné z tabulek na předchozí straně, 3 varianty reagovaly cestou kaulogeneze, tyto varianty byly důkladně statisticky vyhodnoceny. Tabulky č. 7 a 8 zahrnují bodové hodnocení po 8 týdnech kultivace, po tom následovalo pasážování na MS a druhé vyhodnocení po 8 týdnech (tabulka č. 9).

Tyto výsledky byly zpracovány statisticky, jelikož v některých skupinách nebyl splněn předpoklad normálního rozdělení (Shapiro-Wilkův test) a u proměnné 'hmotnost' také předpoklad homogenity rozptylů (Leveneův test), byly výsledky vyhodnoceny neparametrickými testy. Použitím Spearmanova testu pořadové korelace bylo prokázáno, že vztah mezi počtem výhonů a hmotností kalusu není statisticky významný. Hmotnost (a tedy velikost) kalusu tedy není rozhodující pro zisk výhonů. Pro detailnější vyhodnocení byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA. Bylo prokázáno, že odrůda nemá na počet získaných výhonů statisticky průkazný vliv, naopak varianta regulátorů rostlinného růstu má velmi významný vliv. Také bylo zjištěno, že varianta č. 18 se od zbývajících dvou prokazatelně statisticky odlišuje a poskytuje horší výsledky (graf. č.2). Bylo tedy prokázáno, že v tomto případě není přídavek IAA k TDZ potřebný a přídavek 2,4-D má na zisk výhonů negativní efekt.

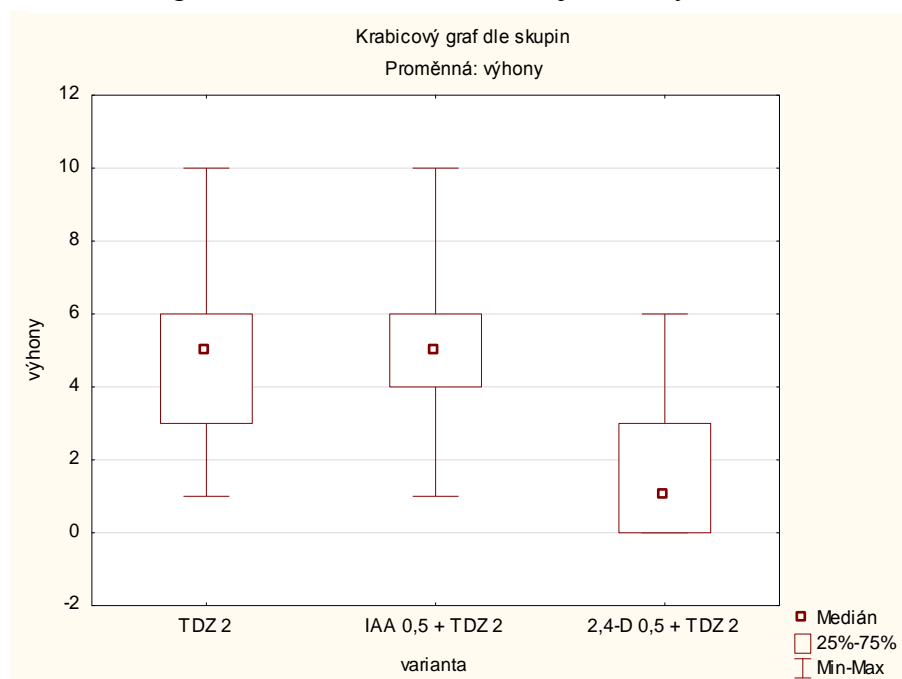
Obr. 8: kaulogeneze, 'Miss Pepper', IAA 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹



Tabulka č. 9: detailní vyhodnocení kaulogeneze, listové explantáty z *in vitro*

Var.	IAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Odrůda	Výhony větší než 1 cm	hmotnost kalusů (g)
23			2	'Miss Pepper'	4,58 ± 2,05	1,512 ± 0,389
				Fuji'	5,12 ± 2,438	1,937 ± 0,45
6	0,5		2	'Miss Pepper'	5 ± 1,936	1,632 ± 0,534
				Fuji'	5,4 ± 2,598	2,409 ± 0,76
18		0,5	2	'Miss Pepper'	2,4 ± 1,93	1,908 ± 0,353
				Fuji'	1,2 ± 1,732	1,572 ± 0,423

Graf č.2: grafické znázornění rozložení jednotlivých variant RRR



Varianta 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ u listových segmentů indukovala somatickou embryogenezi, ale mezi odrůdami zde byl velmi výrazný rozdíl. Zatímco odrůda 'Fuji' na tuto kombinaci RRR reaguje velmi dobře a explantáty regenerují a tvoří embryogenní kalus ve 100 % případů (tabulka č. 8), 'Miss Pepper' zde má velmi špatné výsledky. Znamky regenerace projevilo pouze 40 % listových segmentů (tabulka č. 7) a k tvorbě embryogenního kalusu došlo pouze na 5 explantátech z počátečních 50. Patrná somatická embrya byla pozorována pouze na 1 kalusu.

Vzhledem k povaze výsledků je tato část pokusu vyhodnocena pouze slovně.

Pokus č. 2 - kořenové segmenty

5.1.3 První část - screening

Výsledky prvního pokusu jsou opět vyhodnoceny v souhrnné tabulce, která je uvedena na následující straně (tabulka č. 10). Je z ní patrné, že v případě kořenových segmentů je v reakci hned několik zásadních rozdílů. Ve všech případech bylo dosaženo známek regenerace explantátů (regenerace 100 % ve všech případech), to ale neznamená, že bylo dosaženo 100 % diferenciaci na uspokojivé úrovni. Některé varianty reagovaly pouze slabou tvorbou kalusu bez známek dalšího vývoje.

Dalším rozdílem je překrývání různých vývojových cest u kořenových segmentů, často docházelo například k současné kaulogenezi a rhizogenezi, případně rhizogenezi a somatické embryogenezi.

Tabulka č. 10: předběžné vyhodnocení, kořenové explantáty z *in vitro*, 'Fuji'

Var.	IAA mg. l ⁻¹	NAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace %	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	Poznámky
1	-	-	-	-	-	15	100	+	+	+	-	6 exp. výrazně obráží, tvorba kalusů minimální
2	0,5	-	-	-	-	20	100	+	++	++	-	11 exp. obráží, explantáty zakořeňují, kalus minimální
3	2	-	-	-	-	15	100	+	+	++	-	5 exp. obráží, silnější zakořeňování, kalus minimální
4	0,5	-	-	2	-	15	100	+	++	+	-	9 exp. obráží, zakořeňování slabé, kalus minimální
5	2	-	-	0,5	-	20	100	+	++	++	-	10 exp. obráží, zakořeňování výraznější, kalus minimální
6	0,5	-	-	-	2	20	100	+++	+	-	-	Velké zelené kalusy, slabé náznaky výhonů
7	2	-	-	-	0,5	20	100	+++	+	-	-	7 kalusů obráží, silní tvorba zeleného kalusu
8	-	0,5	-	-	-	20	100	++	-	++	-	Žluté rozpadavé kalusy, část zakořeňuje
9	-	2	-	-	-	20	100	+	-	-	-	Slabě rostoucí žluté rozpadavé kalusy, nezakořeňují
10	-	0,5	-	2	-	20	100	++	-	+	+	Žluté rozpadavé kalusy, náznaky somatické embryogeneze
11	-	2	-	0,5	-	20	100	++	-	+	++	Žluté rozpadavé kalusy, somatická embryogeneze výraznější než u předešlého
12	-	0,5	-	-	2	20	100	+++	-	-	-	Kompaktní zelené kalusy se žlutými sektory

Var.	IAA mg. l ⁻¹	NAA mg. l ⁻¹	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace %	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	Poznámky
13	-	2	-	-	0,5	20	100	++	-	-	+	Kompaktní zelené kalusy se žlutými sektory ve větší míře
14	-	-	0,5	-	-	20	100	++	-	-	-	Slabé žluté rozpadavé kalusy
15	-	-	2	-	-	20	100	+	-	-	-	Slabé žluté rozpadavé kalusy
16	-	-	0,5	2	-	20	100	++	-	-	+++	Žluté embryogenní kalusy, výrazná somatická embrya
17	-	-	2	0,5	-	20	100	+	-	-	-	Slabé žluté rozpadavé kalusy
18	-	-	0,5	-	2	15	100	++	-	-	-	Zelené rozpadavé kalusy
19	-	-	2	-	0,5	20	100	++	-	-	+	Světlé rozpadavé kalusy
20	-	-	-	0,5	-	10	100	+	+++	+	-	9 exp. obráží, kalusy minimální
21	-	-	-	2	-	20	100	+	+++	++	-	14 exp. obráží, kalusy minimální
22	-	-	-	-	0,5	20	100	+++	+	+	-	Velké zelené kalusy, náznaky výhonů
23	-	-	-	-	2	15	100	+++	+	-	-	Ještě větší zelené kalusy, náznaky výhonů

Vyhodnocení variant kde docházelo ke kaulogenezi je patrné v tabulce č. 11, vzhledem k různorodosti variant a často malému množství hodnot byly k vyhodnocení použity pouze procenta a směrodatné odchylky. Z tabulky je patrné, že nejlepších výsledků dosahovaly varianty čisté MS a BAP 0,5 mg.l⁻¹. Varianta IAA 0,5 mg.l⁻¹ dosáhla podobného výsledku, ale bylo v ní pozorováno nadměrné množství defektních rostlin.

Tabulka č. 11 vyhodnocení kaulogeneze, kořenové explantáty z *in vitro*, 'Fuji', žlutě jsou zvýrazněny nejlepší varianty

Var.	IAA mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Výchozí počet explantátů	Explantáty tvořící výhony (%)	Průměrný počet výhonů na explantát ± SD	Počet nevitřif. výhonů na variantu 5 týdnů po pasážování na MS
1	-	-	-	15	40	2,667 ± 2,338	16
2	0,5	-	-	20	55	1,091 ± 1,044	12
3	2	-	-	15	33,33	0,4 ± 0,894	2
4	0,5	2	-	15	60	0,556 ± 0,726	5
5	2	0,5	-	20	55	0,455 ± 0,522	5
6	0,5	-	2	20	25	0	0
7	2	-	0,5	20	40	0	0
20	-	0,5	-	10	90	1,223 ± 1,302	11
21	-	2	-	20	70	0,714 ± 0,726	10
22	-	-	0,5	20	25	0	0
23	-	-	2	15	33,33	0	0

K vyhodnocení variant se somatickou embryogenezi byla použita orientační stupnice, jelikož bylo velmi obtížné přesně určit jejich počet (embrya byla na různých stupních vývoje a často skrytá uvnitř kalusu). Byly zahrnuty varianty 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹, NAA 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹ a NAA 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹. Od každé varianty bylo počítáno 15 kalusů.

Použitá stupnice:

0 - žádná patrná somatická embrya

1 - 1 až 10 patrných somatických embryí

2 - 11 a více patrných somatických embryí

Tabulka č. 12: vyhodnocení somatické embryogeneze, kořenové explantáty z *in vitro*, 'Fuji'

Varianta	Průměr z bodového hodnocení počtu som. embryí na jeden kalus ± SD
2,4-D 0,5 mg.l ⁻¹ + BAP 2 mg.l ⁻¹	1,467 ± 0,64
NAA 0,5 mg.l ⁻¹ + BAP 2 mg.l ⁻¹	0,667 ± 0,617
NAA 2 mg.l ⁻¹ + BAP 0,5 mg.l ⁻¹	0,867 ± 0,516

Jelikož jde pouze o orientační vyhodnocení, bylo následně použito aritmetických průměrů a směrodatných odchylek. Vyhodnocení proběhlo 12 týdnů od založení pokusu a od každé varianty bylo hodnoceno 15 kalusů. Z těchto výsledků vyplývá, že nejvíce vhodná varianta pro indukci somatické embryogeneze u kořenových segmentů odrůdy 'Fuji' je 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹.

5.1.4 Druhá část

Ve druhé části pokusu s kořenovými segmenty byly testovány 2 varianty indukující kaulogenezi, jedna indukující somatickou embryogenezi a jedna kalus, pozdějším pozorováním bylo ale zjištěno, že u varianty stimulující růst kalusu dochází rovněž k somatické embryogenezi. Kalus této varianty byl ovšem nezvykle tmavě zelený (embryogenní kalus *P. paniculata* byl v jiných pokusech spíše zbarven do velmi světle zelené až žluté barvy) a tak tento jev nebyl prvotně pozorován.

Stručné údaje o první fázi kultivace tohoto pokusu jsou v tabulce č. 13 pro 'Miss Pepper' a v tabulce č. 14 pro 'Fuji'.

Tabulka č. 13: předběžné vyhodnocení, druhá část - kořenové explantáty z *in vitro*, 'Miss Pepper'

Var.	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace %	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	Poznámky
1	-	-	-	50	100	+	-	+	-	Všechny explantáty přežívají, ale nedochází k prorůstání výhonů
20	-	0,5	--	50	100	+	+	+	-	3 explantáty plnohodnotně obráží, další 3 náznakem
18	0,5	-	2	50	100	+++	-	-	+++	Zelené velké kalusy, rozpadavé, pravděpodobně embryogenní
16	0,5	2	-	50	100	++	-	-	++	Žluté rozpadavé kalusy, patrná somatická embrya

Tabulka č. 14: předběžné vyhodnocení, druhá část - kořenové explantáty z *in vitro*, 'Fuji'

Var.	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	Počet ex.	Regenerace %	Kalus	Kaulogeneze	Rhizogeneze	Som. em.	Poznámky
1	-	-	-	50	100	+	+++	+	-	23 explantátů tvoří shluky výhonů
20	-	0,5	-	50	100	+	+++	+	-	27 explantátů tvoří shluky výhonů
18	0,5	-	2	50	100	+++	-	-	++	Světle zelené velké kalusy, méně rozpadavé, pravděpodobně embryogenní
16	0,5	2	-	50	100	++	-	-	+++	Žluté rozpadavé kalusy, patrná somatická embrya ve větším množství

Při vyhodnocení kaulogeneze byl pozorován velmi významný rozdíl mezi odrůdami - na rozdíl od 'Fuji' u 'Miss Pepper' k růstu výhonů z kořenů prakticky nedocházelo ani při delší době kultivace na iniciačním médiu. U odrůdy 'Fuji' bylo, co se týče variant, dosaženo srovnatelných výsledků, potvrdila se ovšem domněnka, že je vhodné nechat explantáty na iniciačním médiu růst déle a následně jednotlivé výhony oddělit od sebe a pasážovat je jednotlivě. Touto metodou byla z velké části eliminována vitifikace regenerantů a bylo dosaženo vyšší úspěšnosti. Také bylo potvrzeno, že nejvýkonnější variantou pro indukci kaulogeneze z kořenových segmentů je BAP 0,5 mg.l⁻¹.

V následující tabulce (č. 15) jsou uvedeny výchozí počty explantátů, procenta explantátů u kterých bylo indukováno prorůstání výhonů, počty výhonů získané na variantu a vyhodnocení jejich vývoje 5 týdnů po pasážování na MS.

Tabulka č. 15: vyhodnocení kaulogeneze z kořenových explantátů, druhá část pokusu

Var.	Odrůda	Výchozí počet explantátů	Explantáty tvořící výhony (%)	Počet pasážovaných výhonů na variantu	Počet vitálně rostoucích výhonů 5 týdnů po pasážování	Počet zakořeňujících výhonů 5 týdnů po pasážování
MS	'Miss Pepper'	50	0	0	0	0
	'Fuji'	50	46	37	37	24
BAP 0,5 mg.l ⁻¹	'Miss Pepper'	50	6	4	3	2
	'Fuji'	50	54	56	56	39

Vyhodnocení somatické embryogeneze je uvedeno v tabulce č. 16 a bylo opět zpracováno s využitím pomocné stupnice:

- 0 - žádná patrná somatická embrya
- 1 - 1 až 10 patrných somatických embryí
- 2 - 11 a více patrných somatických embryí

Tyto varianty byly hodnoceny po 12 týdnech od založení pokusu, ve všech případech regenerovalo 100 % explantátů (50 od každé varianty).

Tabulka č. 16: vyhodnocení som. embryogeneze z kořenových explantátů, druhá část pokusu

Varianta	Odrůda	Průměr z bodového hodnocení počtu som. embryí na jeden kalus ± SD
2,4-D 0,5 mg.l ⁻¹ + TDZ 2 mg.l ⁻¹	'Miss Pepper'	1,44 ± 0,541
	'Fuji'	1 ± 0,67
2,4-D 0,5 mg.l ⁻¹ + BAP 2 mg.l ⁻¹	'Miss Pepper'	0,6 ± 0,639
	'Fuji'	0,98 ± 0,622

Z výsledků a porovnání s ostatními pokusy ve kterých probíhala somatická embryogeneze je patrné, že v případě kořenových segmentů odrůda 'Miss Pepper' reaguje výrazně lépe než při použití listových explantátů a dosahuje lepší produkce somatických embryí na médiu 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹. U Odrůdy 'Fuji' se v tomto pokusu tato varianta také projevila jako efektivnější. Rozdíl je také v podobě kalusu - varianta obsahující TDZ tvoří velké tmavě zelené rozpadavé kalusy, embryogenní kalusy z jiných variant RRR jsou spíše žluté nebo velmi světle zelené a tmavší embrya jsou na nich dobře patrná.

Obr. 9: detail embryogenního kalusu odrůdy 'Fuji' získaného kombinací 2,4-D a BAP



Pokus č. 3 - kalusy

Nejprve byly vyhodnoceny kalusy z listových segmentů získané z první části pokusu č. 1. Pro jednodušší statistické vyhodnocení byly výsledky rozděleny do 3 tabulek podle výchozích variant RRR na kterých byly kalusy získány. Vzhledem k cíli dosažení kaulogeneze toto rozdělení nevadí, protože jde o varianty které se v základu liší reziduálním účinkem RRR přítomných v primárním médiu.

První jsou kalusy získané na médiu NAA 2 mg. l⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l⁻¹, v tomto případě nebyly naplněny předpoklady homogenity rozptylů a normality dat, byla tedy použita Kruskal-Wallisova ANOVA. Tou bylo prokázáno, že pro indukci kaulogeneze je nejlepší použití varianty TDZ 0,5 mg. l⁻¹.

Tabulka č. 17: vyhodnocení indukce kaulogeneze na kalusech z NAA 2 mg. l⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l⁻¹, 'Fuji'

Primární médium ze kterého pochází kalusy	Druhé médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po prvním počítání	Třetí médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po druhém počítání
NAA 2 mg. l ⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l ⁻¹	MS	0	MS	0
	TDZ 0,5 mg. l ⁻¹	0		1,25 ± 1,035
	TDZ 2 mg. l ⁻¹	0		1,125 ± 1,126

V případě kalusů z varianty 2,4-D 0,5 mg. l⁻¹ + TDZ 2 mg. l⁻¹ byly splněny předpoklady homogenity rozptylů i normality dat. K vyhodnocení byla tedy použita jednofaktorová ANOVA a Dunncanův test pro rozdělení porovnávaných hodnot do homogenních skupin. Bylo jasně prokázáno, že v tomto případě je nejvíce vhodné pro indukci kaulogeneze použití čistého MS média.

Tabulka č. 18: vyhodnocení indukce kaulogeneze na kalusech z 2,4-D 0,5 mg. l⁻¹ + TDZ 2 mg. l⁻¹, 'Fuji'

Primární médium ze kterého pochází kalusy	Druhé médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po prvním počítání	Třetí médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po druhém počítání
2,4-D 0,5 mg. l ⁻¹ + TDZ 2 mg. l ⁻¹	MS	4,75 ± 2,435 b	MS	5,5 ± 2,564 b
	TDZ 0,5 mg. l ⁻¹	1 ± 0,894 a		2,333 ± 1,033 a
	TDZ 2 mg. l ⁻¹	2,75 ± 1,669 ab		3,5 ± 2,07 ab

U kalusů pocházejících z média 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l⁻¹ předpoklady použití standardní ANOVy neplatí, byla tedy opět využita Kruskal-Wallisova ANOVA. Tou bylo potvrzeno použití TDZ 0,5 mg. l⁻¹, varianta TDZ 2 mg. l⁻¹ vykazovala statistickou shodu s TDZ 0,5 mg. l⁻¹, ale zároveň odpovídala i čistému MS (i když velmi těsně).

Tabulka č. 19: vyhodnocení indukce kaulogeneze na kalusech z 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l⁻¹, 'Fuji'

Primární médium ze kterého pochází kalusy	Druhé médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po prvním počítání	Třetí médium	Průměrný počet výhonů na kalus ± SD po druhém počítání
2,4-D 2 mg. l ⁻¹ + TDZ 0,5 mg. l ⁻¹	MS	0	MS	0
	TDZ 0,5 mg. l ⁻¹	0,833 ± 1,17		1,5 ± 1,378
	TDZ 2 mg. l ⁻¹	0,167 ± 0,408		1,167 ± 1,169

Obr. 10: detail prorůstajících kalusů (varianta 2,4-D 0,5 mg. l⁻¹ + TDZ 2 mg. l⁻¹) po prvním pasážování na MS



Ve druhé fázi byla testována možnost vyvolání kaulogeneze na kalusech, které byly získány z kořenových segmentů v první části pokusu č.2. Tyto kalusy byly málo vitální, žluté a rozpadavé.

Tento pokus byl ukončen když ani jeden kalus ani jedné testované varianty nejevil známky změny vývoje na žádném ze 3 použitých médiích (MS, TDZ 0,5 mg. l⁻¹, TDZ 2 mg. l⁻¹).

Pokus č. 4 - nodální segmenty

V tomto pokusu byly vyhodnoceny nejprve získané výhony na jednu kultivační 100 ml baňku, která obsahovala 4 výchozí nodální explantáty. Předpoklad výrazné multiplikace výhonů z axilárních pupenů nebyl ani v jednom případě naplněn, nodální segmenty vytvořily maximálně 2 výhony, častěji 1 a část jich neregenerovala vůbec. Vzhledem k tomuto typu vyhodnocení nebylo možné stanovit průměrné hodnoty na jeden explantát, ale pouze na variantu.

Nebyly naplněny předpoklady pro použití standardní ANOVy, byla tedy použita neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA, podle které nemá odrůda statisticky významný vliv na počet výhonů. Statisticky významná je pouze použitá varianta. Prokazatelný statisticky významný rozdíl byl pouze mezi variantami BAP 5 mg. l⁻¹ a TDZ 0,25 mg. l⁻¹. Toto zjištění je dobře vidět na grafu č. 3.

Z tabulky č. 21 je zřejmé, že vliv odrůdy je pouze u poslední varianty (TDZ 0,25 mg. l⁻¹), což se na celkovém vlivu neprojevuje.

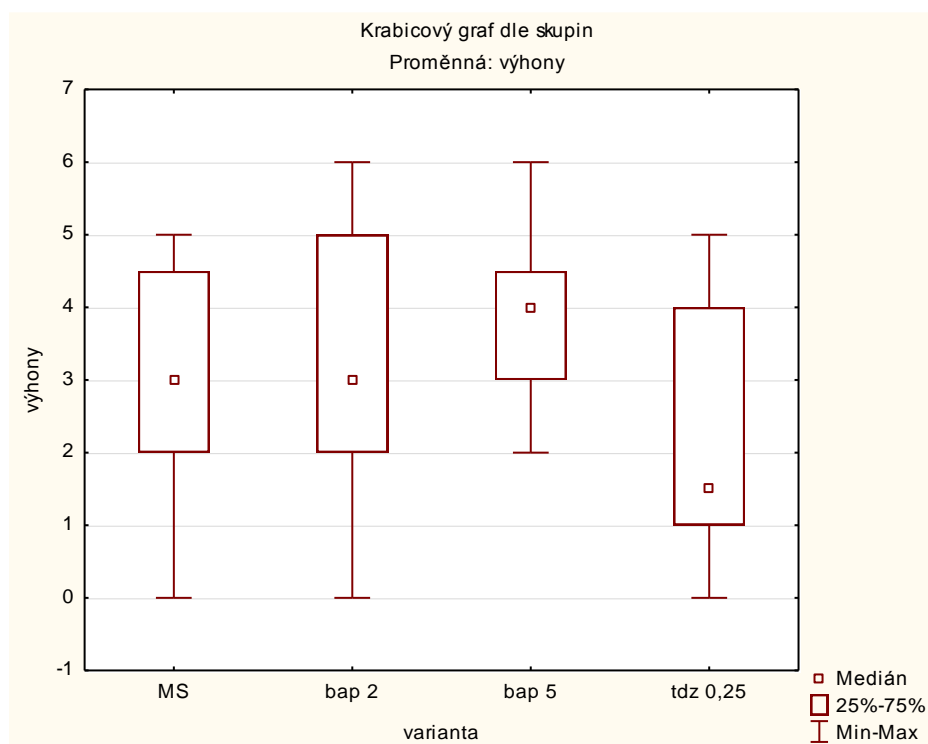
Tabulka č. 20: vyhodnocení regenerací nodálních segmentů

Varianta	Odrůda	Počet nodů	Regenerace (%)
(MS)	'Miss Pepper'	36	86,11
	'Fuji'	40	97,5
BAP 2 0,5 mg. l ⁻¹	'Miss Pepper'	40	90
	'Fuji'	40	95
BAP 5 0,5 mg. l ⁻¹	'Miss Pepper'	40	95
	'Fuji'	40	100
TDZ 0,25 0,5 mg. l ⁻¹	'Miss Pepper'	40	97,5
	'Fuji'	40	100

Tabulka č. 21: vyhodnocení zisku výhonů z nodálních segmentů

Varianta	MS		BAP 2 mg. l ⁻¹		BAP 5 mg. l ⁻¹		TDZ 0,25 mg. l ⁻¹	
	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'
Baňka 1	0	2	0	1	5	5	4	1
Baňka 2	5	5	2	2	3	4	4	0
Baňka 3	5	4	6	3	4	6	3	2
Baňka 4	0	4	6	1	4	3	3	1
Baňka 5	3	5	3	5	3	5	5	1
Baňka 6	4	3	4	3	2	4	5	0
Baňka 7	1	4	1	4	4	4	4	1
Baňka 8	3	5	4	5	4	3	4	1
Baňka 9	3	2	6	2	3	4	3	1
Baňka 10	3	1	5	2	4	5	1	0
Celkem výhonů na 40 výchozích nodů	27	35	37	28	36	43	36	8
Průměr ± SD	2,7 ± 1,829	3,5 ± 1,434	3,7 ± 2,163	2,8 ± 1,476	3,6 ± 0,843	4,3 ± 0,95	3,6 ± 1,174	0,8 ± 0,632

Graf č.3: grafické znázornění rozložení jednotlivých variant RRR



Druhá tabulka (č. 22) znázorňuje úspěšnost ujmoutí pasážovaných výhonů na čisté MS, zde je vidět, že varianta kde došlo k největší produkci výhonů (BAP 5 mg. l⁻¹) dosahovala při vyhodnocení po 8 týdnech nejnižšího počtu rostoucích rostlin, které splňovaly kritéria. Tento jev byl dán vyšším výskytem vitrifikovaných a jinak defektních jedinců.

Největší rozdíl v rámci varianty byl u TDZ 0,25 mg. l⁻¹, kde byla reakce odrůd značně odlišná, 'Miss Pepper' reagovala srovnatelně jako na ostatních variantách, s tím, že zde byl větší nárůst kalusu, který ovšem nenarušoval vývoj výhonů. 'Fuji' na této variantě tvořila velké kalusy, které naopak prorůstání výhonů takřka potlačily. Většina výhonů z této varianty proto nesplňovala kritéria hodnocení a pro vysokou míru vitrifikace nebylo možné je dále pasážovat.

Údaje o počtu zakořeňujících rostlin jsou zde pouze doplňující a znázorňují velmi dobrou schopnost těchto vybraných odrůd tvořit kořeny (a tak rostliny vhodné pro převod do podmínek *ex vitro*) v médiu bez přidaných auxinů stimulujících zakořenění.

Tabulka č. 22: vyhodnocení převodu výhonů z nodálních segmentů

Varianta	MS		BAP 2 mg. l ⁻¹		BAP 5 mg. l ⁻¹		TDZ 0,25 mg. l ⁻¹	
	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'	'Miss Pepper'	'Fuji'
Počet pasážovaných výhonů	27	35	37	28	36	43	36	8
Počet rostoucích výhonů větší než 2 cm (%)	22 (81,48)	35 (100)	35 (94,59)	23 (82,14)	22 (61,11)	30 (69,77)	36 (100)	8 (100)
Zakořeňující výhony	18	35	34	22	20	28	33	6

Obr. 11: růst nodálních segmentů na MS (levá) a TDZ (pravá), odrůda 'Fuji'



Pokus č. 5 - okvětní lístky

5.1.5 Desinfekce okvětních lístků

Všechny varianty desinfekce explantátů z okvětních lístků měly 100% účinnost - nebyla pozorována žádná kontaminace. Explantáty ale po dvou týdnech kultivace odumřely bez jakýchkoliv náznaků regenerace. Vzhledem ke zdravotnímu stavu donorových rostlin pokus nemohl být opakován a byl ukončen.

Pokus č. 6 - prašníky, androgeneze

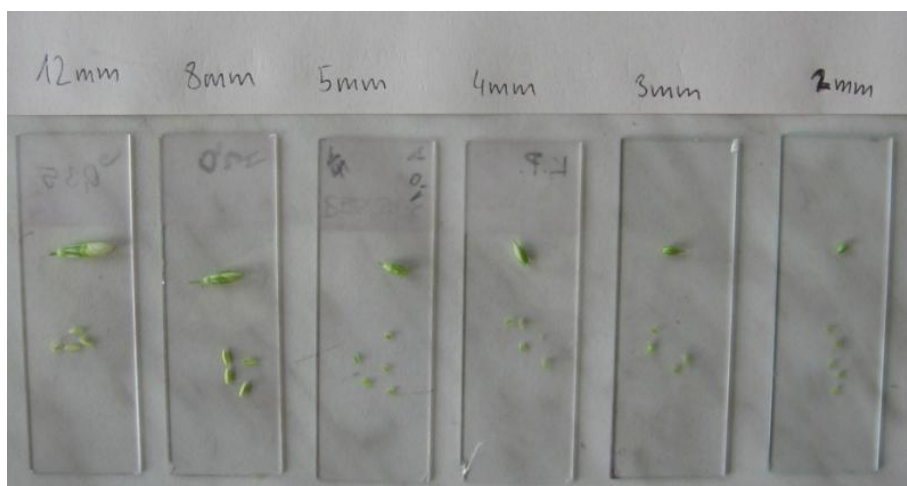
5.1.6 Ověření optimální zralosti prašníků a pupat

Pozorováním prašníků (barvených acetokarmínem) pod mikroskopem bylo zjištěno, že v případě *Phlox paniculata* je vývoj mikrospor nejednotný - v jednotlivých prašnicích se nacházelo více vývojových stádií mikrospor. Jako optimální byly tedy zvoleny prašníky ve kterých byla větší část mikrospor stále před první pylovou mitózou - jednojaderné mikrospory. Toto odpovídalo nejmenším pupatům, která byla z donorových rostlin odebrána, velikost celého pupate v optimální fázi byla pouhé 2 mm, prašníky měřily cca. 1,5 mm. Takováto pupata ještě neměla ani patrné okvětní lístky.

Obr. 12: porovnání velikostí částí poutat



Obr. 13: testovaná poutata s vypreparovanými prašníky



5.1.7 Desinfekce poutat

Obě testované varianty sterilizace poutat byly úspěšné - nedošlo ke kontaminaci kultur a prašníky nebyly poškozeny. V pokusu byla tedy dále použita první varianta - 70% ethanol (20 sekund), pak 10 % SAVO + smáčedlo po dobu 10 minut a nakonec promytí sterilní destilovanou vodou (3x 15 min). Vzhledem k nulové kontaminaci nebyl důvod použít druhou variantu s 20 minutami působení.

5.1.8 Indukce tvorby kalusu

Vzhledem k povaze výsledků a zcela zřejmému rozdělení byly v tomto pokusu nadále k vyhodnocování použita pouze procenta a/nebo slovní hodnocení. Indukce tvorby kalusů a jejich následný vitální růst byly jednoznačně nejvíce úspěšné na médiu obsahujícím 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ TDZ (var. č. 4). Na tomto médiu bylo dosaženo regenerace prašníků ve 40,830 % případů a vitálně rostoucí kalus byl získán ve 25 % případů. Zhruba poloviční úspěšnosti dosahovala varianta 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BAP (var. č. 4). Při použití samotného 2,4-D (2 mg.l⁻¹ 2,4-D, var. č. 6) sice v regeneraci nebyl výrazný rozdíl oproti předchozí variantě, ale vitalita a růst kalusů silně zaostávaly. Varianty s čistým MS, BAP a TDZ se projevily jako zcela neefektivní a dále nebudou komentovány.

Tabulka č. 23: vyhodnocení indukce růstu kalusu z prašnickových explantátů

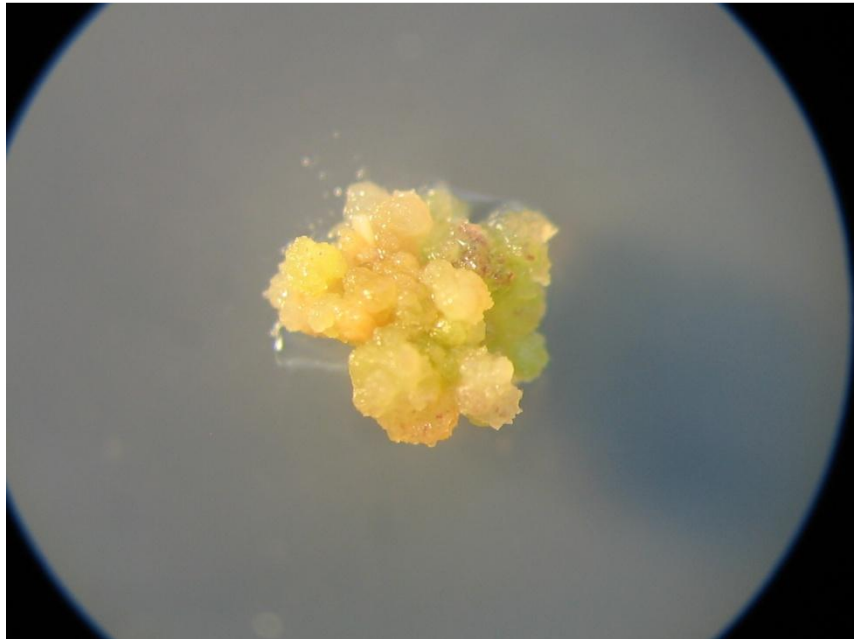
Var.	2,4-D mg. l ⁻¹	BAP mg. l ⁻¹	TDZ mg. l ⁻¹	počet založených prašníků	regenerace (ks)	regenerace (%)	kalus větší než 2 mm (ks)	kalus větší než 2 mm (%)
1	-	-	-	120	4	3,334	0	0
2	-	1	-	120	3	2,5	1	0,834
3	-	-	1	120	5	4,167	2	1,667
4	2	-	1	120	49	40,834	30	25
5	2	1	-	160	41	25,625	19	11,875
6	2	-	-	160	36	22,5	9	5,625

5.1.9 Multiplikace kalusů a indukce organogeneze

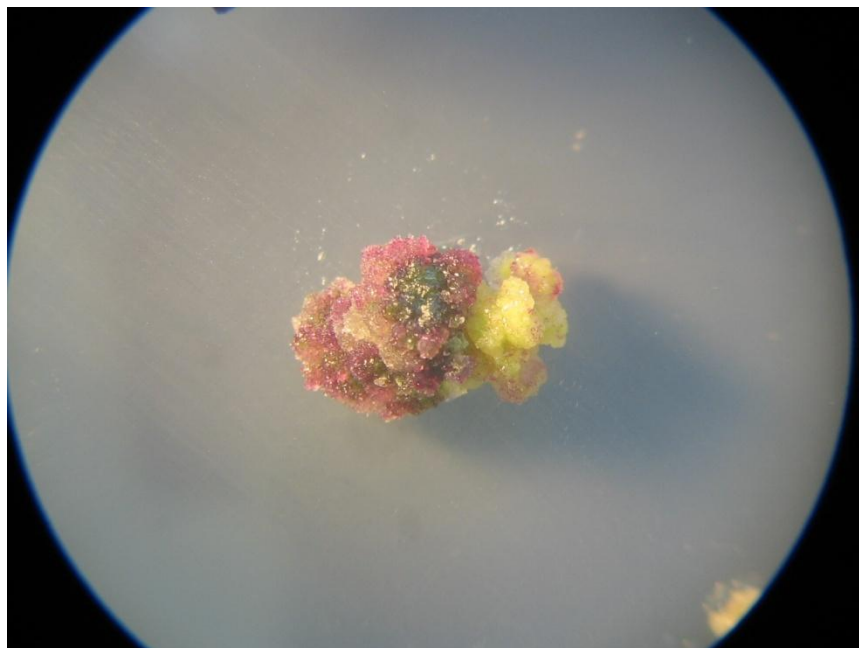
Protože získané kalusy byly velice malé (velikost pouze výjimečně dosahovala 1 cm), nebylo možné přímo zahájit indukci organogeneze a dosáhnout zisku regenerantů. V následující části pokusu tedy byla testována možnost multiplikace kalusů následovaná pasážováním na médium indukující prorůstání výhonů. Mezi multiplikačními médii je složité určit to nejlepší, protože ve všech skupinách je příliš málo kalusů. Z tabulky č.24 je ale možné usuzovat, že stále významně přetrvává vliv indukčního média. Na indukční variantě se samotným 2,4-D (2 mg.l⁻¹ 2,4-D, var. č. 6) došlo k odumření všech kalusů na všech testovaných multiplikačních médiích, tato varianta tedy z pokusu vypadla. Také kalusy z kombinace 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BAP (var. č. 5) reagovaly na pasážování na multiplikační média hůře a pouze se prohluboval rozdíl oproti variantě č. 4, která se potvrdila jako nejlepší. Mezi multiplikačními médii na variantě č. 4 nebyly pozorovány významné

rozdíly, ty by se pravděpodobně ukázaly až s větším množstvím kalusů. Nezávisle na variantě některé kalusy vykazovaly výrazné fialové zbarvení anthokyany. Organogeneze byla stimulována médiem 2 mg.l^{-1} IAA + $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ TDZ a bylo jí docíleno pouze na dvou kalusech (var. č. 4) - byly získány 2 a 4 výhony.

Obr. 14: kalus indukovaný na 2 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} TDZ, foceno v průběhu multiplikace na $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ IAA + 1 mg.l^{-1} TDZ, velikost zhruba 1 cm



Obr. 15: kalus indukovaný na 2 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} TDZ, foceno v průběhu multiplikace na 1 mg.l^{-1} NAA + 2 mg.l^{-1} BAP, velikost zhruba 1.2 cm



Tabulka č. 24: přehled vývoje kalusů od prvního pasážování po získání rostlin

Indukční varianta (mg.l ⁻¹)	multiplikační varianta (mg.l ⁻¹)	počet převedených kalusů	počet žijících a rostoucích 8.týden	počet výrazně rostoucích (větší než 1cm) 8.týden	Slabě rostoucí kalusy 10.týden	Kalusy větší než 1 cm 10.týden	Počet kalusů, kde došlo k organogenezi	počet regenerovaných rostlin na MS
MS + 9 % sach.	TDZ 2 + IAA 0,5	1	0	0	0	0	0	0
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	2	0	0	0	0	0	0
	BAP 2 + NAA 1	1	0	0	0	0	0	0
BAP 1 mg.l ⁻¹	TDZ 2 + IAA 0,5	1	0	0	0	0	0	0
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	1	0	0	0	0	0	0
	BAP 2 + NAA 1	1	0	0	0	0	0	0
TDZ 1 mg.l ⁻¹	TDZ 2 + IAA 0,5	2	0	0	0	0	0	0
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	1	1	0	1	0	0	0
	BAP 2 + NAA 1	2	0	0	0	0	0	0
TDZ 1 + 2,4-D 2 mg.l ⁻¹	TDZ 2 + IAA 0,5	17	8	1	5	3	1	4
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	16	8	0	6	2	0	0
	BAP 2 + NAA 1	16	8	2	5	3	1	2
2,4-D 2 mg.l ⁻¹	TDZ 2 + IAA 0,5	12	0	0	0	0	0	0
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	12	0	0	0	0	0	0
	BAP 2 + NAA 1	12	0	0	0	0	0	0
BAP 1 + 2,4-D 2 mg.l ⁻¹	TDZ 2 + IAA 0,5	14	5	0	3	2	0	0
	TDZ 2 + 2,4-D 0,5	14	1	0	1	0	0	0
	BAP 2 + NAA 1	13	3	0	3	0	0	0

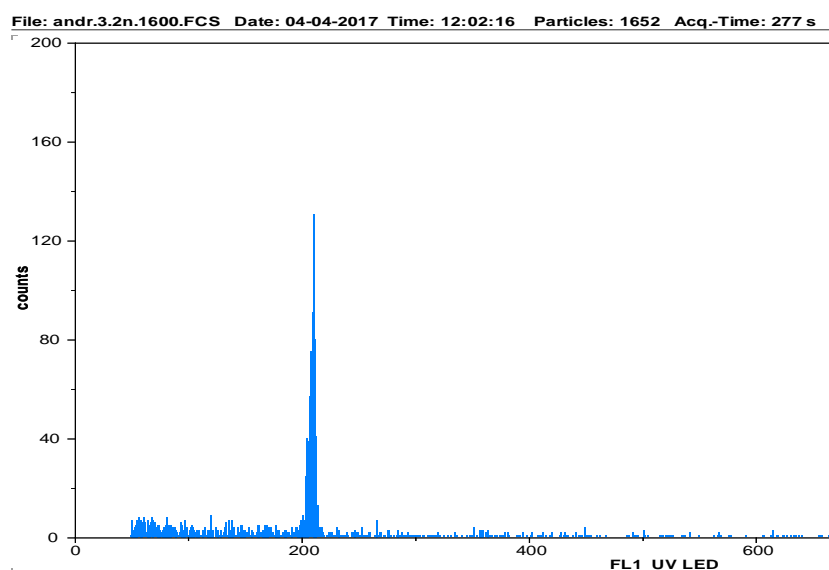
5.1.10 Testování ploidie regenerantů

Celkem bylo proměřeno 18 vzorků - 6 rostlin a 10 kalusů, další dva vzorky byly kontrolní rostliny (2n a 4n 'Fuji'). Výsledky ukázaly, že mezi testovanými rostlinami se nenachází ani jedna haploidní - překvapením to bylo hlavně u fenotypově odlišné rostliny, která v podmínkách *in vitro* vykvetla (u *P. paniculata* se jedná o velice ojedinělý jev), vzorky z kalusů, které se obtížněji proměřují (více 'šumu') dopadly obdobně, ale je z nich patrná výrazně větší heterogenita než u výhonů. Pouze jeden kalus vykazoval zastoupení buněk v 1n a 4n oblasti s takřka chybějícími 2n. Tento kalus byl označen za nejvíce perspektivní a vhodný k další kultivaci s potenciálem získat haploidní nebo tetraploidní rostliny.

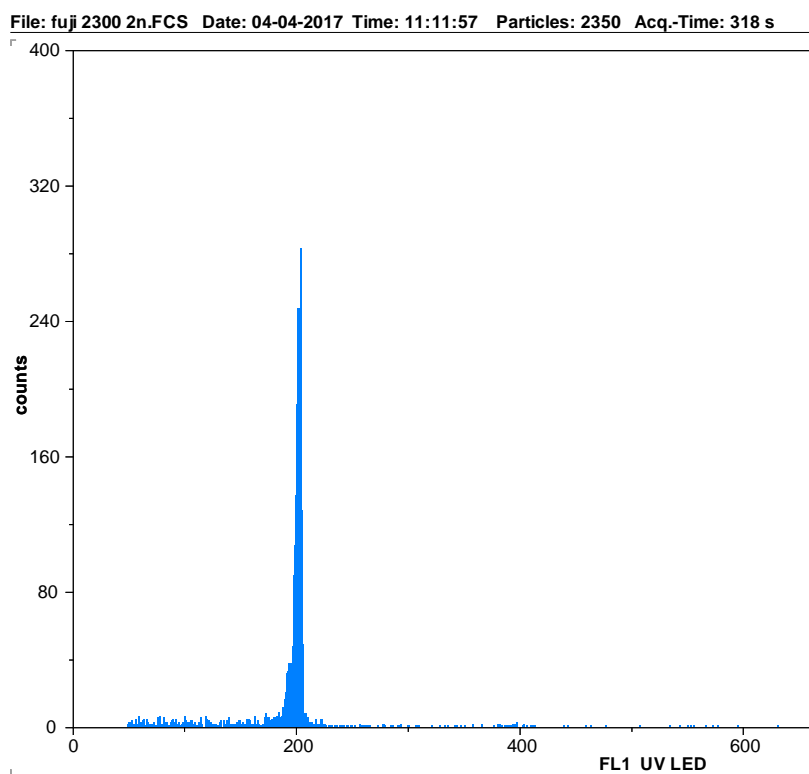
Obr. 16: atypická získaná kvetoucí rostlina



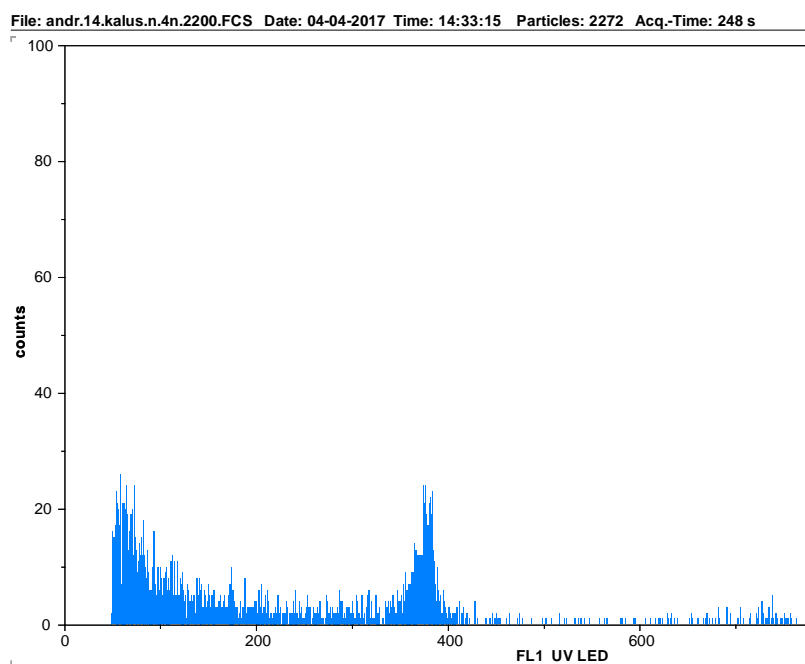
Obr. 17: potvrzení, že atypická rostlina je diploidní



Obr. 18: kontrola - 'Fuji' 2n



Obr. 19: kalus, jediný vzorek s výrazně odlišným složením, získán na 2 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} TDZ, multiplikováno na 1 mg.l^{-1} NAA + 2 mg.l^{-1} BAP



6 Diskuse

Listové segmenty

V tomto pokusu byly nejprve testovány listové explantáty ze skleníkové 'Fuji', vzhledem k původu explantátů tedy bylo nutné provést jejich povrchovou sterilizaci. K tomu byl využit postup, který se již v praxi osvědčil. Bylo použito 20 % SAVO (0,94 % NaClO) se smáčedlem, což odpovídá doporučení Matisky (2009), který uvádí koncentraci 0,5 - 1 % NaClO. Kombinaci 20 % SAVO + smáčedlo po dobu 10 minut doporučuje také Šašek (2015). Declerk and Korban (1995) pro sterilizaci listů použili 0,43 % NaClO se smáčedlem po dobu 10 minut, což se ze zkušeností může zdát jako slabé. Naopak Fraga et al. (2004) ke sterilizaci využili extrémní koncentraci 3,5 % NaClO po dobu 15 - 20 minut, to je velmi zvláštní, když vezmeme v úvahu, že neředěné SAVO má 4,7 % NaClO a Matiska (2009) uvádí, že koncentrace 30 % přípravku SAVO již výrazně poškozuje explantáty.

Kultivace probíhala na MS médiu se 3 % sacharózy, zde nebyl důvod testovat jiné médium, protože MS je použito mnoha publikacích zabývajících se kultivací plamenky latnaté *in vitro*, použili ho například Declerk and Korban (1995), Jain et al. (2002), Matiska (2009) a další. Fraga et al (2004) dokoce testovali i použití K média, které ovšem poskytovalo horší výsledky než MS.

Při první fázi pokusu s listovými segmenty bylo testováno 22 variant RRR a čisté MS médium, po 6 týdnech bylo provedeno vyhodnocení a varianty byly roztříděny do skupin: kaulogeneze, rhizogeneze, somatická embryogeneze, tvorba nediferencujícího kalusu a zbytek, který představoval neperspektivní varianty, které dále nebyly řešeny. Vzhledem k povaze explantátů bylo důležité už zhodnocení regenerace (patrné růstové odezvy na působení RRR), protože část variant neregenerovala vůbec a některé další pouze sporadicky. V případě kaulogeneze bylo nejlepších výsledků dosaženo kombinací IAA a TDZ, také byla prokázána statisticky významná odlišnost takto kombinovaných variant od samotného TDZ. Toto zjištění plně odpovídá výsledkům které publikovali Vejsadová a Matiska (2007). Také Matiska (2009) tuto kombinaci doporučuje. Vzniká zde tedy neshoda, jelikož Declerk and Korban (1995) doporučují raději použít BAP, protože TDZ vyvolává příliš silný růst kalusu. Pozitivní vliv BAP na kaulogenezi listových explantátů se ale potvrdit nepodařilo, což je v souladu s výsledky které publikoval Matiska (2009). BAP byl, ve zde prezentovaných pokusech, velmi vhodný jako doplněk médií určených k vyvolání somatické embryogeneze (vždy s auxinem), nebo pro vyvolání růstu výhonů na kořenových explantátech. Při porovnání

výsledků indukce kaulogeneze u listových explantátů ze skleníku a z *in vitro* podmínek je vidět zajímavý rozdíl. V případě explantátů z *in vitro* podmínek bylo statisticky prokázáno, že přídavek IAA k TDZ není významný, dále bylo také prokázáno, že odrůda nemá na kaulogenezi vliv. Tento jev má jistě původ v odlišné distribuci a koncentraci nativních fytohormonů ve zdrojových rostlinách.

Rhizogeneze z listových segmentů nebyla považována za důležitou, protože zvolené odrůdy zakořeňují bez větších problémů z výhonů bez použití RRR. Kořeny získané na NAA se pravděpodobně jako explantáty příliš nehodí, protože je očekáván reziduální účinek NAA, které má podle Matisky (2009) ve většině případů spíše negativní vliv. Také nejlepších výsledků dosahovala varianta s NAA 0,5 mg.l⁻¹, při vyšší koncentraci se projevoval spíše růst kalusu a organogeneze byla potlačována, tento poznatek je v souladu s Fraga et al. (2004).

U somatické embryogeneze byl v případě listových segmentů pozorován výrazný meziodrůdový rozdíl, na variantě 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ dochází u 'Fuji' k 100 % regeneraci a tvorbě embryogenního kalusu, což potvrzuje výsledky, které uvádí Šašek (2015) a ve volnější interpretaci i Vejsadová et al. (2016), kteří použili stejnou kombinaci, ale nižší koncentrace. Odrůda 'Miss Pepper' ale na tuto variantu reaguje velice špatně. Známek regenerace bylo dosaženo pouze u 40 % explantátů a jen 10 % jich vytvořilo embryogenní kalus, který měl sklony v krátké době odumřít.

Kořenové segmenty

Pokus s kořenovými segmenty byla zahájen stejným screeningem jako u listových explantátů, v tomto případě ale rozřazení variant tak jasné nebylo. Navíc se potvrdila myšlenka, že plamenka latnatá výborně regeneruje z kořenů - žádné kořenové segmenty neodumřely. V případě kaulogeneze se pravděpodobně projevila přirozená schopnost kořenů obrůstat (jedna z nejlepších variant bylo čisté MS bez RRR) a je tedy žádoucí jí pouze napomoci například přidáním BAP, použití velmi účinných variant s TDZ nemělo požadovaný efekt, jelikož došlo k růstu masivního kalusu který použitelné výhony netvořil. Je zvláštní, že tvrzení Declerk and Korban (1995) tedy v tomto případě výborně sedí na kořenové explantáty, ale u listových segmentů se nepodařilo potvrdit.

Ve druhé fázi pokusu byl zjištěn další meziodrůdový rozdíl - na zvolených velmi efektivních variantách z první části s 'Fuji' (MS a BAP 0,5 mg.l) totiž 'Miss Pepper' takřka neobráží - z 50 explantátů nebyl na MS získán žádný výhon a na BAP 0,5 mg.l⁻¹ pouze 3 (u

'Fuji' to bylo 37 a 56). Zde by tedy bylo na místě vyzkoušet například právě zmíněné TDZ k nastartování růstu kalusu a následným pasážováním získat výhony.

Somatická embryogeneze z kořenových explantátů byla také překvapující - v první části pokusu (pouze 'Fuji') byla detailněji vyhodnocena 3 média a nejlepších výsledků dosáhlo 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + BAP 2 mg.l⁻¹, tedy přesně opačná varianta než u listů. Tento jev dokazuje, že i v rámci jedné rostliny může být reakce na RRR na různých místech naprosto odlišná. V druhé fázi byla přidána varianta 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹, která zdánlivě tvořila pouze zelený drobný kalus, ale při detailním průzkumu se ukázala jako embryogenní varianta. Ze vzájemného porovnání s první variantou a mezi odrůdami dokonce vyšla jako efektivnější. Zmínku o somatické embryogenezi na médiu s TDZ publikovali Vejsadová a Matiska (2007). Pro praktické využití se ale jevila lépe prvně zmíněná varianta. V Případě 2,4-D a TDZ byla sice embrya vytvořena, ale vysoká koncentrace TDZ pravděpodobně potlačovala jejich další vývoj a vedla pouze k intenzivnímu nárůstu hmoty kalusu. Zde by bylo vhodné otestovat snížení koncentrace TDZ - z použité 2 mg.l⁻¹ na 0,25 - 1 mg.l⁻¹ (Matiska a Vejsadová (2007) zaznamenali somatickou embryogenezi při koncentraci 0,5 a 1 mg.l⁻¹).

Kalusy

Regenerace kalusů v první části tohoto pokusu potvrdila, že varianta z NAA 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ regenerovala po dodání médií s TDZ špatně a na MS vůbec, tento výsledek patrně souvisí s reziduálním účinkem NAA. Fraga et al. (2004) totiž uvádí, že koncentrace NAA vyšší než 0,5 mg.l⁻¹ má na organogenezi výrazně negativní vliv. Pro vyhovující míru regenerace výhonů na takových variantách je tedy pravděpodobně nutné pasážování vícekrát opakovat a tím odstranit inhibiční vliv NAA.

V případě 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + TDZ 0,5 mg.l⁻¹ tuto negativní roli s největší pravděpodobností přebírá 2,4-D, které k indukci organogeneze využíváno není. K získání výhonů bylo nutné opět přidat média s TDZ, která účinek 2,4-D 'naředí'. Vzhledem k původní vysoké koncentraci 2,4-D v iniciačním médiu by i v tom případě bylo na místě pasážování opakovat několikrát.

Nejlépe regenerovala varianta obsahující 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹, zde docházelo naopak k nejintenzivnějšímu prorůstání výhonů po pasážování na MS, jelikož TDZ již v explantátu působilo dostatečně a na čistém médiu překonalo efekt 2,4-D. Tuto teorii také

potvrzuje fakt, že nejhorší míra kaulogeneze byla pozorována na následném médiu s $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ, pravděpodobně proto, že už ho tam jednoduše bylo moc. Matiska (2009) také uvádí, že využití TDZ ve vyšší koncentraci než $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ nemá smysl, jelikož je potlačeno prorůstání prýtů.

Nody

Při testování regenerace nodálních segmentů bylo cílem docílit vícenásobného prorůstání pupenů. Tohoto cíle dosaženo nebylo, protože nodální segmenty tvořily, bez ohledu na médium, maximálně 2 výhony, častěji ale pouze jeden a některé dokonce nevytvářely vyhodnotitelné výhony vůbec (častá vitifikace). Ve výsledku bylo tedy většinou z varianty získáno méně rostlin, než bylo v základu nodálních explantátů. Když se započítá ještě následná úspěšnost dopěstování regenerantů nelze o nějaké multiplikaci mluvit. U odrůdy 'Fuji' bylo získáno nejvíce výhonů na variantě BAP $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (43), ale množství zdravě rostoucích po převodu zaostávalo, z tohoto hlediska byla tedy lepší varianta MS (35 zdravě rostoucích výhonů). U 'Miss Pepper' byly reakce obdobné až na jednu výjimku - varianta TDZ $0,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zde byla jedna z nejlepších, ale u 'Fuji' byla nejhorší (růst kalusu a vitifikace znemožnily další vývoj výhonů). Tyto získané hodnoty zaostávají za výsledky, které získali Fraga et al. (2004). Například u odrůdy 'Blue Boy' se jim podařilo při použití samotného BAP získat průměrně až 14,7 výhonu na nodální explantát. takový výsledek je zcela mimo rámec zde popisovaných pokusů. U ostatních odrůd sice Fraga et al. (2004) získali výhonů méně, ale třeba u 'Starfire' to bylo pořád průměrně až 4,7 výhonu. Nejméně výhonů získali na odrůdě 'Orange Perfection' - zde je vytvořila jen zhruba polovina nodů s průměrem 1,7 až 2,5 výhonu. Rozdíl může být dán faktem, že v této práci byly testovány nodální segmenty z *in vitro*, ale Fraga et al. (2004) použili nody ze skleníkových rostlin.

Okvětní lísky

Pokus s okvětními lísky byl ukončen po tom co ani jeden z nich neregeneroval. A je velice pravděpodobné, že minimálně na nějakých z testovaných médií by se jinak reakce projevila, jelikož byly zkoušeny i velmi silné varianty jako kombinace IAA a TDZ. Nejpravděpodobnější se jeví možnost, že explantáty byly příliš poškozeny při sterilizaci. A to i přes to, že byly testovány 4 varianty sterilizace. Vzhledem k odebírání pupat na prašnickové explantáty a celkovému zdravotnímu stavu donorové rostliny již nebylo možné v dostatečné míře pokus zopakovat. Pro srovnání například Palmer and Keller (2011) úspěšně docílili

kaulogeneze z okvětních lístků třezalky tečkované. Pro sterilizaci využili zhruba 1% roztok NaClO (Odpovídá 20% roztoku přípravku SAVO) po dobu 20 minut a explantáty tuto desinfekci přežily. Je ale možné, že okvětní lístky plamenky jsou náchylnější, nebo již byly rostliny velmi oslabené, případně může být použití přípravku SAVO po explantáty horší než obdobná koncentrace samotného NaClO.

Prašníky, androgeneze

Tento pokus částečně vycházel z publikace pojednávající o androgenezi u příbuzného druhu *Phlox drummondii*, kterou publikovali Radzan et al. (2008).

Podle toho článku a podle pozorování (světelný mikroskop) prašníků barvených acetokarmínem byla stanovena optimální velikost pupat (2 mm), kdy je v prašnicích většina mikrospor v jednojaderném stádiu. Pro srovnání například Jia et al. (2014) prašníky *Primula Forbesii* barvili karbol-fuchsinem a jako optimální stanovili velikost, kdy byly mikrospory v pozdně jednojaderném až raně dvoujaderném stádiu.

Prašníky byly odebrány mezi 8 a 9 hodinou ráno, což zhruba odpovídá termínu odběru v publikaci od Radzan et al. (2008). Následně bylo třeba je povrchově sterilizovat. Radzan et al. (2008) u *Phlox drummondii* použili nejprve 1 % savlon se smáčedlem (10 minut), pak omytí destilovanou vodou a 0,1 % HgCl₂ (5 min) následované 3x omytím sterilní dest. vodou. Tento postup byl příliš komplikovaný a navíc zahrnoval velmi toxický chlorid rtuťnatý, proto byla hledána jiná alternativa. Jia et al. (2014) použili u *Primula Forbesii* zcela jiný postup: pupata nejprve 1 hodinu promývali vodou, následovala první sterilizace v 70 % ethanolu (30 sekund) a po ní druhá ve 2 % NaClO (8 - 10 minut), nakonec byla pupata 3x promyta sterilní destilovanou vodou. Tento postup ale zahrnuje použití 2 % NaClO, což bylo vyhodnoceno jako příliš silná koncentrace a byl tedy navržen vlastní lehce modifikovaný způsob. Hodinové promývání vodou bylo vynecháno, následoval 70 % ethanol (20 sekund) a dvě varianty koncentrace NaClO - 0,47 % a 0,94 % (10 a 20% SAVO) s působením 10 a 20 minut. Nakonec byla pupata 3x promyta sterilní destilovanou vodou. Tento šetrnější postup se ukázal 100% úspěšný u všech 4 variant a byla tedy používána ta nejšetrnější - 0,47 % NaClO 10 minut.

Dále byla testována různá média pro indukci růstu kalusů z prašníků. Podle Radzan et al. (2008) bylo jako základ médií zvoleno MS s 9 % sacharózy. Vyšší úspěšnost variant s 9 % sacharózy je pravděpodobně způsobena pozitivním vlivem osmotického stresu na průběh indukce prašníků. Pro stimulaci růstu kalusu byla vybrána nejlepší varianta, kterou použili

Radzan et al. (2008) - 2,4-D 2 mg.l^{-1} + BAP 1 mg.l^{-1} (koncentrace jsou zaokrouhlené vinou převodů jednotek, originál byl 2,4-D $2,2104 \text{ mg.l}^{-1}$ + BAP $1,1265 \text{ mg.l}^{-1}$), dále byla použita průměrná varianta 2,4-D 2 mg.l^{-1} (v originálu 2,4-D $2,2104 \text{ mg.l}^{-1}$). K těmto dvěma byly přidány varianty obsahující TDZ, které se u plamenky latnaté velmi osvědčilo. Kultivace probíhala v souladu se vzorovou publikací prvních 8 týdnů ve tmě a zbytek času při fotoperiodě 16/8. Předpoklad pozitivního vlivu TDZ se vyplnil - nejvíce prašníků vytvořilo kalus na navržené variantě 2,4-D 2 mg.l^{-1} + TDZ 1 mg.l^{-1} (40,834 %), velmi významnou roli ale patrně hraje i auxin 2,4-D, protože samotné TDZ 1 mg.l^{-1} zcela propadlo. Druhý a třetí nejlepší výsledek byl získán na médiích odvozených z publikace o *P. drummondii* - 25,625 % u 2,4-D 2 mg.l^{-1} + BAP 1 mg.l^{-1} a 22,5 % u 2,4-D 2 mg.l^{-1} . Těmito výsledky je opět podpořena domněnka o významnosti 2,4-D, protože varianta se samotným BAP byla zcela neúspěšná, stejně tak jako použití samotného TDZ. Je ovšem nutné dodat, že na samotném 2,4-D byla sice pozorována uspokojivá míra regenerace, ale po následném pasážování všechny kalusy této varianty odumřely. Z tohoto hlediska tedy použití samotného 2,4-D nelze doporučit. Dosažené míry regenerací rámcově odpovídají výsledkům, kterých v této fázi dosáhli Radzan et al. (2008), ale jsou výrazně vyšší než hodnoty, které získali působením různých koncentrací 2,4-D a BAP Jia et al. (2014) (tvorba kalusu maximálně v řádu jednotek procent).

Získané kalusy byly ve většině případů velmi malé a bylo třeba je multiplikovat, k tomuto účelu bylo zvoleno médium které po zaokrouhlení vychází z Radzan et al. (2008) a to NAA 1 mg.l^{-1} + BAP 2 mg.l^{-1} . Další dvě média byla navržena se zastoupením TDZ. Vzhledem k relativně malému množství rostoucích kalusů je vyhodnocení nejlepšího multiplikačního média problematické, s využitím poznatků z předchozích pokusů o stimulaci kaulogeneze na různých kalusech z listových segmentů se lze domnívat, že by bylo získání výhonů možné na všech 3 variantách, jelikož v multiplikaci mezi nimi nebyly významné rozdíly.

Po fázi multiplikace bylo nutné indukovat kaulogenezi a získat výhony, k tomuto účelu využili Radzan et al. (2008) médium s BAP $1,69 \text{ mg.l}^{-1}$. Tato varianta se ale nezdála být příliš dobře využitelná u *P. paniculata*, která na BAP nereaguje moc dobře, což potvrzuje Matiska a Vejsadová (2007), Matiska (2009) a Šašek (2015). Jia et al. (2014) použili jako diferenciační médium NAA $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ + BAP $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, takto kombinace ale vzhledem k předchozím poznatkům pravděpodobně také není v případě plamenky využitelná. Byla tedy použita varianta kombinující IAA a TDZ, kterou doporučují Matiska a Vejsadová (2007) a

Matiska (2009). Médium záměrně obsahovalo IAA 2 mg.l^{-1} + TDZ $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, z důvodu, že 2 multiplikační varianty již 2 mg.l^{-1} TDZ obsahovaly a další tak velká koncentrace by prorůstání výhonů spíše potlačila. Kalusy, které na tomto médiu jevíly známky zakládání výhonů byly následně pasážovány na čisté MS. Vzhledem k nedostatku času se podařilo získat výhony pouze ze dvou nejvíce vitálních kalusů (4 a 2 výhony). V této fázi byl získán výhon, který byl považován za haploidní - měl výrazně redukované listy a vzdálenosti mezi internodií a navíc začal po několika týdnech kultivace kvést (květy byly výrazně deformované). Tento jev je u trvalky jako je *P.paniculata* krajně neobvyklý.

K otestování ploidie regenerantů a nejvíce perspektivních kalusů, které nestihly vytvořit výhony, byla použita průtoková cytometrie. Proměřením regenerovaných rostlin byla domněnka o haploidním jedinci vyvrácena - všechny testované výhony byly diploidní. I u kalusů byly pozorovány píky převážně v $2n$ oblasti, i když se zde objevovalo nápadně vyšší zastoupení i v jiných místech, které svědčí o heterogenitě takových kalusů. Pouze jeden testovaný kalus postrádal $2n$ oblasti a naopak vykazoval zhruba shodné zastoupení v $1n$ a $4n$. Tento kalus byl tedy označen za nejvíce perspektivní a dalším pasážováním z něj snad budou získány zajímavé rostliny.

7 Závěr

- Testovaná hypotéza nebyla plně potvrzena, protože explantáty z okvětních lístků se nepodařilo zregenerovat. Není ale důvod se domnívat, že tento typ explantátu nemůže regenerovat a vytvořit rostliny, protože v tomto případě došlo pravděpodobně k přílišnému poškození během povrchové desinfekce.
- Při indukci kaulogeneze z listových segmentů je nejvíce efektivní kombinace IAA + TDZ, v případě explantátů z *in vitro* rostlin může být použito samotné TDZ.
- Naopak při indukci kaulogeneze z kořenových segmentů odrůdy 'Fuji' je vhodné používat pouze MS, případně BAP, odrůda 'Miss Pepper' na tento způsob množení reaguje velmi špatně a není pro ní vhodný.
- Somatickou embryogenezi se podařilo indukovat z listových segmentů uspokojivě pouze u 'Fuji'. Bylo prokázáno, že testovaná varianta pro použití na listové explantáty (2,4-D 2 mg.l^{-1} + BAP $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) velmi dobře funguje v opačném složení na kořenové segmenty. Na toto složení reagují dobře i kořenové explantáty 'Miss Pepper'. V případě kořenových ex. lze použít i kombinaci 2,4-D a TDZ, to se ale nejví tak vhodné, protože somatická embrya jsou velmi špatně rozlišitelná.
- Použití nodálních segmentů se pro multiplikaci neosvědčilo, protože bylo získáno méně rostlin, než bylo výchozích explantátů. 'Fuji' nejlépe reagovala na MS a BAP 2 mg.l^{-1} , zatímco 'Miss Pepper' na TDZ $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ a BAP 2 mg.l^{-1} .
- Zelené vitálně rostoucí kalusy je možná donutit ke kaulogenezi použitím čistého MS nebo TDZ, významnou roli hrají reziduální účinky silných RRR z původního média.
- Žluté a málo vitální rozpadavé kalusy se nepodařilo indukovat ke kaulogenezi nebo nějaké změně na MS ani na TDZ.
- Z prašnickových explantátů se cestou nepřímé androgenese úspěšně podařilo získat kalusy a následně i rostliny. Pro získání kalusů byla nejvhodnější médium 2,4-D 2 mg.l^{-1} + TDZ 1 mg.l^{-1} , které indukovalo růst kalusu ve 40,834 % případů. Vzhledem k nejvyššímu počtu kalusů se z této varianty ve výsledku podařilo regenerovat 6 rostlin, které měly původ ve 2 explantátech. Jedna z těchto rostlin byla výrazně odlišná a vykvetla.
- Testováním regenerovaných rostlin a perspektivních kalusů bylo prokázáno, že všechny získané rostliny jsou diploidní. Mezi proměřovanými kalusy byl nalezen jeden který vykazoval zastoupení 1n a 4n buněk, přičemž 2n takřka chyběly.

8 Zdroje

- Asif, M. 2013. Progress and Opportunities of Doubled Haploid Plants. Springer International Publishing. p. 75. ISBN: 9783319007311
- Beyl, C. A. 2011. PGRs and Their Use in Micropropagation. In: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (eds.). Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC press, Boca Raton (FL). p. 33 - 56. ISBN: 9781420083279
- Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. p. 318. ISBN: 9788132210269
- Böhm, Č. 1991. Trvalky: ozdoba zahrady i bytu. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha. 112 s. ISBN: 8085362066
- Brickell, CH. 2008. A-Z encyklopedie zahradních rostlin. Knižní klub. Praha. 1128 s. ISBN 9788024220697
- Declerk, V., Korban, S. S. 1995. Shoot regeneration from leaf tissue of *Phlox paniculata* L. Plant Physiology. 147. p. 441 – 446
- Fraga, M, Alonso, M., Borja, M. 2004. Shoot Regeneration Rates of Perennial Phlox are Dependent on Cultivar and Explant Type. Hortscience. 39 (6). 1373 – 1377
- Gahan, P. B., George, E. F. 2008. Adventitious Regeneration. In: George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G.J.D. (eds.). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer. Dordrecht. p. 355 - 402. ISBN: 9781402050046
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., Thorpe, T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 32. p. 272 - 289
- Golovkin, B. N., Kliková, G. a kol. 1990. Trvalky: rozkvetlá zahrada (1). Lidové nakladatelství. Praha. 352 s. ISBN: 8070220538

Hadziabdic, D., Wadl, P. A., Reed, S. M. 2011. Haploid Cultures. In: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (eds.). Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC press, Boca Raton (FL). p. 385 - 396. ISBN: 9781420083279

Chloupek, O. 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha. 312 s. ISBN: 9788020015662

Jain, A., Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. Scientia Horticulturae. 94. 137 – 143

Jha, T. B., Gosh, B. 2005. Plant Tissue Culture: Basic and Applied. Universities Press. New Delhi. p. 206. ISBN: 8173714886

Jia, Y., Zhang, Q. X., Pan, H. T., Wang, S. Q., Liu, Q. L., Sun, L. X. 2014. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. Scientia Horticulturae. 176. p. 273 - 281

Matiska, P. 2005. Vysoké letní plamenky (*Phlox*). Zahradnictví. 97 (8). 34 – 35

Matiska, P. 2006. Využití metod *in vitro* pro množení trvalek. Zahradnictví. 98 (4). 34 – 35

Matiska, P., Vejsadová, H. 2007. Induction of morphogenesis in *Phlox paniculata* L. In: The tree and flower a part of life. VÚKOZ. Průhonice, p. 225 – 227

Matiska, P. 2009. Využití metod *in vitro* pro získání výchozích šlechtitelských materiálů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.). Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 199 s.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15. p. 473 – 497

Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology. 34. p. 267 - 275

- Neumann, K. H., Kumar, A., Imani, J. 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. Springer - Verlag. Berlin. p. 325. ISBN: 9783540938828
- Palmer, C. D., Keller, W. A. 2011. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum Perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105. p. 129 - 134
- Procházka, S., Šebánek, J. a kol. 1997. Regulátory rostlinného růstu. Academia. Praha. 380 s. ISBN: 8020005978
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. 1998. Fyziologie rostlin. Academia. Praha. 460 s. ISBN: 8020005862
- Radzan, A., Radzan, M. K., Rajam, M. V., Raina, S. N. 2008. Efficient protocol for in vitro production of androgenic haploids of *Phlox drummondii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 95. p. 245 - 250
- Rice, G. (ed.). 2006. Royal Horticultural Society Encyclopedia of Perennials. Dorling Kindresley. London. p. 496. ISBN: 1405306009
- Schnabelrauch, L. S., Sink, K. C. 1979. In vitro propagation of *Phlox subulata* and *Phlox paniculata*. HortScience. 14(5). p. 607-608
- Skoog, F., Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia Society for Experimental Biology, 54 (11), p. 118 – 130
- Šafránková, I. 2006. Patogeny plamenky. Zahradnictví. 3. 36 – 37
- Šašek, O. 2015. Indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in vitro*. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů. Praha. 56 s.

Vejsadová, H., Matiska, P., Obert, B., Ürgeová, E., Preťová, A. 2016. Somatic embryogenesis in *Phlox paniculata* - histological analysis. *Biologia*. 71 (7). p. 763 - 768

Zhao, H., Wang, X., Du, Y., Zhu, D., Guo, Y., Gao, J., Li, F., Snyder, J. C. 2014. Haploid Induction via *In vitro* Gynogenesis in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 13 (10). p. 2122 - 2131

Internetové zdroje

Anonym. FUJIYAMA (MOUNT FUJI). Russian Phlox Society. [online]. [cit. 2017-02-11]. Dostupné z <<http://russianphlox.com/catalog/kustovyie-floksyi-zarubejnoj-selektivii/fujiyama-mount-fuji/>>

Anonym. MISS PEPPER. Russian Phlox Society. [online]. [cit. 2017-02-11]. Dostupné z <<http://russianphlox.com/catalog/kustovyie-floksyi-zarubejnoj-selektivii/miss-pepper/>>

Hartmut, R. *Phlox paniculata* Mount Fuji. Helenium - Phlox. [online]. [cit. 2017-02-11]. Dostupné z <<http://www.helenium-phlox.de/phlox/mount-fuji>>

Hartmut, R. *Phlox paniculata* Miss Pepper. Helenium - Phlox. [online]. [cit. 2017-02-11]. Dostupné z <<http://www.helenium-phlox.de/phlox/miss-pepper>>

9 Seznam použitých zkratek

2,4 - D - Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

BAP - 6-benzylaminopurin

Ex. - Explantát

IAA - Kyselina indolyl-3-octová

MS - Murashige and Skoog medium

NAA - Kyselina 1-naftyloctová

RRR - Regulátor rostlinného růstu

Som. em. - Somatická embryogeneze

TDZ - Thidiazuron

Var. - Varianta