

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



Indukce tetraploidních rostlin u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) a možnosti následné detekce ploidie.

Diplomová práce

Autor práce: Antonín Cvrček

Obor studia: AMZZ

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Indukce tetraploidních rostlin u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) a možnosti následné detekce ploidie" jsem vypracoval 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 uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4. 2017

Antonín Cvrček

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Pavlu Matiskovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování mé diplomové práce věnoval. Dále bych chtěl poděkovat panu doc. Ing. Františkovi Hniličkovi, Ph.D. za odborné konzultace.

Indukce tetraploidních rostlin u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) a možnosti následné detekce ploidie.

Souhrn:

Phlox paniculata (plamenka latnatá) patří mezi známou trvalku oblíbenou pro bohaté květenství. Své uplatnění nalezne ve spoustě typů trvalkových společenstev jak na běžné zahradě, tak i zámeckých zahradách a městských parcích. Tvorba tetraploidních odrůd má u tohoto druhu význam převážně ze šlechtitelského hlediska, z důvodu zdvojeného počtu párů chromozomů se získá větší variabilita při dalším množení a může se zvýšit odolnost proti patogenům. V této diplomové práci byla testována indukce polyploidních rostlin u odrůd: Miss pepper, Marge, Lichtcom, Windsor, Dragon a možnosti následné detekce polyploidie. Pokusy byly prováděny na listech odebraných ze skleníků ČZU i na listech rostlin pěstovaných v *in vitro*. Jako rostlinný materiál byly zvoleny listové segmenty velikosti cca 0,5 cm², jejichž regenerace a kultivace probíhala na MS médiu obohaceném o IAA 2,5 mg. l⁻¹ a TDZ 1,5 mg. l⁻¹. Pro navození tetraploidů byly zvoleny dvě koncentrace oryzalinu (40 μmol. l⁻¹ a 20 μmol. l⁻¹) a dvě různé doby jeho působení (7 a 14 dní). Kultivace založených pokusů probíhala v inkubátoru s řízenou teplotou a 16 hodinovou fotoperiodou. Následná regenerace explantátů je časově náročná, z tohoto důvodu se podařilo k testování na ploidiu získat jen omezené množství výhonů od odrůdy Marge a Miss pepper. Jako standard byla použita ověřené diploidní odrůda Fuji a z ní odvozené tetraploidní odrůda Fujix. Protože se u tetraploidních rostlin předpokládá vyšší obsah chlorofylů, bylo prvním způsobem zjišťování zvýšené ploidie zvoleno měření obsahu chlorofylů přístrojem chlorofylmetrem a také metodou Porra měření obsahu chlorofylů a karotenoidů. Naměřené hodnoty u měření chlorofylů a karotenoidů byly také podrobeny statistické analýze s využitím programu Statistica 12. Získané hodnoty chlorofylů nebyly jednoznačné, a proto mohly sloužit pouze k orientačnímu odhadu. Z tohoto důvodu se přistoupilo k osvědčené metodě zjišťování ploidie na průtokovém cytometru. Testováno bylo 48 rostlin od odrůdy Miss pepper a 54 rostlin od odrůdy Marge. Z měření na průtokovém cytometru jsme u odrůdy Marge neodhalily žádnou tetraploidní rostlinu, u odrůdy Miss pepper se podařilo odhalit 10 tetraploidních rostlin.

Klíčová slova: *phlox*, *in vitro*, polyploidizace, oryzalin, průtokový cytometr

Induction of tetraploid plants in tall phlox (*Phlox paniculata*) and the possibility of detection their ploidy.

Summary:

Phlox paniculata belongs among the well-known and popular perennial. It finds application in many types of perennial communities whether in ordinary garden and the castle gardens or city parks. Induction of tetraploid plants of this species has a great significance mainly from a breeding point of view, because double the number of chromosomes produce larger variation during further propagation and may increase the resistance to pathogens. In this thesis has been tested induction of tetraploid plants at varieties: Miss pepper, Marge, Lichtcom, Windsor, Dragon, Feur Pyramide and P1 and option of subsequent ploidy detection. Experiments were performed as *in vitro* applications. As plant material were used leaf segments size about 0.5 cm². MS medium supplemented with 0.25 mg IAA. l⁻¹ and TDZ 0.15 mg. l⁻¹ was used for regeneration of leaf segments. Two oryzalin concentrations (40 μmol. l⁻¹ and 20 μmol. l⁻¹) were used to obtain tetraploids. Polyploidizing agent infiltration from the culture medium took place over periods of 7 and 14 d. All cultures were incubated under 16 hours photo period and controlled temperature. Explant survival rate of tested plants was limited. Shoot regeneration was obtained only at varieties Marge and Miss pepper and they were used for detection of ploidy level. Varieties diploid Fuji and tetraploid Fujix were used as verified standards. Since it is assumed in tetraploid plants there is higher content of chlorophyll, so that was measured by instrument chlorophyllmeter. Also the contents of chlorophyll and carotenoid were measured by method Porry. The chlorophyll and carotenoid contents were evaluated by the software program Statistica 12. The obtained chlorophyll values were not clear and could only be used for the estimate. For this reason Flow cytometry was used for confirmation of polyploidy. From variety Miss pepper were tested 48 plants and 54 plants from variety Marge. The results from the measurement on the flow cytometer revealed no tetraploid plant at the variety Marge. Value of tetraploids was the highest in 10 explants at the variety Miss Pepper with application of 40 μmol. l⁻¹ oryzaline for 14 days.

Keywords: *phlox*, polyploidy, *in-vitro*, oryzalin, flow cytometr

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Phlox paniculata (Plamenka latnatá)	3
3.2 Rod Phlox (plaménka)	3
3.3 Druh Phlox paniculata (plamenka latnatá)	3
3.3.1 Choroby a škůdci.....	4
3.3.2 Množení	5
3.3.3 Historie šlechtění plamének.....	6
3.4 In vitro kultury	6
3.4.1 Regenerační schopnosti rostlin.....	7
3.4.2 Typy reakcí explantátů v kultuře in vitro	8
3.4.3 Totipotence, dediferenciace, diferenciacce, apoptóza	9
3.4.4 Regenerace ze založených základů a regenerace de novo.....	10
3.4.5 Regenerace přímá a nepřímá.....	10
3.4.6 Kultury organizovaných buněčných struktur (meristémové kultury).....	10
3.4.7 Meristémy (dělivá pletiva)	11
3.4.8 Organogeneze	12
3.4.9 Embryogeneze in vitro	14
3.4.10 Embryogeneze zygotická	15
3.4.11 Embryogeneze gametofytická	15
3.4.12 Embryogeneze somatická	16
3.4.13 Somatická polyembryogeneze.....	18
3.5 Genetické nestability v explantátových kulturách	19
3.6 Vybavení laboratoře pro biotechnologii rostlinných explantátů	19
3.6.1 MS médium.....	20
3.6.2 Chemomutageny.....	20
3.6.3 Růstové látky.....	21
3.7 Detekce ploidie	21
3.7.1 Polyploidní kultury a indukce polyploidie u Phlox paniculata	21
3.7.2 Měření obsahu chlorofylu v listech pomocí chlorofylmetru CCM-200	23
3.7.3 Měření obsahu chlorofylu podle Porra	24
3.7.4 Měření a detekce ploidie pomocí průtokového cytometru	24
4. Metodika	26
4.1 Příprava materiálu.....	26

4.2 Testování ploidie	30
5. Výsledky	33
6. Diskuze	48
7. Závěr	52
8. Seznam použité literatury.....	53
9. Použité zkratky	57
10. Seznam grafů a tabulek:	58
11. Přílohy	59

1. Úvod

Phlox paniculata (plamenka latnatá) je trvalka z čeledi *Polemoniaceae* (jirnicovité). Její původ sahá do východní a střední části USA, odkud byla později rozšířena do celého světa jako ideální rostlina sortimentů zahrad a parků. V současné době jsou známy stovky odrůd, často mezidruhových kříženců. Nejčastěji používané typy vegetativního množení, u kterých jsou zachovány odrůdové vlastnosti, jsou u plamenky latnaté kořenové a stonkové řízků a dělení trsů. U těchto typů množení je však nízký množitelský koeficient, a proto nejsou pro dostatečnou produkci příliš vhodné. Další možností je pak množení *in-vitro*. Tento typ množení má oproti klasickým metodám značné výhody, lze jej použít v jakémkoli ročním období, jeho množitelský koeficient je daleko vyšší a lze ho použít v případě, že původní porost je napaden nějakým patogenem i k jeho ozdravení. V současné době jsou od spotřebitelů stále více vyžadovány nové a kvalitnější odrůdy phloxů. Jednou z možností, jak tohoto cíle dosáhnout je navození tetraploidů v podmínkách *in vitro*. Tetraploidní odrůdy mají zmnožený genetický materiál, proto je možné u nově vzniklých kříženců získat vyšší variabilitu. Díky zdvojené sadě počtu chromozomů mohou také pomoci k obnově plodnosti některých jedinců. Tetraploidní rostliny navíc mohou mít další atraktivní vlastnosti jako větší zajímavější květy, větší listy, intenzivnější zbarvení a silnější stonky.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo iniciovat tvorbu tetraploidních odrůd u druhu *Phlox paniculata* v podmínkách *in-vitro* a porovnávat možnosti následné detekce ploidie. Součástí práce bylo posouzení využití nejvhodnějších odrůd k polyploidizaci. V některých aspektech se ověřovaly výsledky z předešlých prací. V průběhu práce byly použity informace z hlediska vhodnosti použití jednotlivých odrůd plamenky. Počty zregenerovaných explantátů jsou vyjádřeny v procentech. Pro detekci tetraploidních rostlin bylo nutné dopěstování dostatečného množství rostlinného materiálu v podmínkách *in vitro* k laboratornímu testování. Součástí práce byla i samotná detekce polyploidie, a to pomocí měření obsahu chlorofylů a měření na průtokovém cytometru.

3. Literární rešerše

3.1 *Phlox paniculata* (Plamenka latnatá)

Biologická klasifikace:

- Říše: *Plantae* (rostliny)
- Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)
- Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)
- Třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné)
- Řád: *Polemoniales* (jirnicotvaré)
- Čeleď: *Polemoniaceae* (jirnicovité)
- Rod: *Phlox* (plamenka)
- Druh: *Phlox Paniculata* (plamenka latnatá)

(Novák a Skalický, 2009)

3.2 Rod *Phlox* (plaménka)

Phlox patří do čeledi vytrvalých bylin *Polemoniaceae* (jirnicovité). Jsou to byliny rozšířené převážně v Severní a Jižní Americe, můžeme je nalézt i v Evropě. *Phlox paniculata* je diploidní organismus, počet chromozómů základní sady je $n=7$ ($2n=14$) (Dostál, 1989). Plamenky se vyznačují listy různého tvaru s pětičetnými srostlokorunnými květy v hustých vrcholících a plodem je tobolka (Novák a Skalický, 2009). U nás můžeme z volně rostoucích druhů z čeledi *Polemoniaceae* nalézt pouze *Polemonium coeruleum* (Jirnice modrá). Má jasně modré až nafialovělé květy a upřednostňuje světlé lesy. Občas se pěstuje i jako okrasná rostlina na zahradách, mnohdy také v bělokvětvých formách (Novák, 1981). Mnohem častěji se však jako okrasné trvalky na zahradách pěstují habitem nižší severoamerické druhy z čeledi *Polemoniaceae* (*P. drummondii* a drobná skalnička *P. subulata*). Původem do stejné skupiny patří i plamenka *Phlox paniculata* (plamenka latnatá), (Novák a Skalický, 2009).

3.3 Druh *Phlox paniculata* (plamenka latnatá)

Jedná se o vyšší dekorativní trvalku z atlantské Severní Ameriky (Novák, 1981), kde roste na březích řek (Böhm, 1991) a která vyniká zejména bohatým květenstvím v bílých, růžových nebo fialových či lila modrých tónech květů, které navíc s nastupujícím večerem krásně voní (Novák a Skalický, 2009). Samotný název plamenka má původ v řeckém slově *phlox* =

plamen. Tento název získal díky zářivě červeným květům u původní divoké formy rostoucí na přirozených stanovištích (Golovkin, a kol., 1986). Vysoké plamenky dorůstají výšky až 100 cm a jsou to velmi efektní trvalky s pestrými barvami, tento dojem potvrzují i slova významného zahradního šlechtitele dr. K. Foerster, jenž napsal o vzhledu plamenek: “Život bez plamenek je omyl, chybí mu korunní klenot“. Díky nápadným a neobyčejně krásným květům se plamenka uplatní na okrasných zahradách, v parcích, ve smíšených výsadbách, ale i jako řezaná květina do váz (Böhm, 1991). Nápadné zbarvení květů dodává plamenkám přítomnost antokyanů v buňkách. Barva květů se mění podle reakce buněčné šťávy, je-li reakce kyselá, květy bývají červené, v neutrální šťávě fialové a v zásadité modré (Černohorský 1967). Ve vhodných podmínkách pro růst plamenky může tato rostlina dobře působit i samostatně nebo v menších skupinách či řadách. Zajímavě působí i v kontrastu vedle nízkých trvalek. Plamenky, jak již lze odvodit z místa původního výskytu potřebují humózní, živnou a stále vlhkou půdu, polostín a příznivé mikroklima, kterého docílíme na vhodném stanovišti, někdy je vhodné plamenky nastýlat proti přeschnutí mulčovací kůrou (Golovkin a kol., 1986).

3.3.1 Choroby a škůdci

Plamenky jsou poměrně odolné trvalky, zranitelné bývají zejména na méně vhodných stanovištích, špatně připraveném záhonu a při špatném průběhu počasí (Böhm, 1991). Nejčastějším patogenem je všeobecně známé padlí – *Erysiphe magnicellulata* (*E. cichoracearum*) a *Sphaerotheca fusca* (*S. fuliginea*), (Anonym 1, 2017).

Nepříznivé je vlhké a teplé počasí. Hlavním charakteristickým znakem je objevení moučnatého bělavého povrchu na listech a květech. Při prvních příznacích napadení padlím je nutná opakovaná aplikace některého z registrovaných přípravků, např. Sulikol K, Rovral Flo a mnoho dalších.

Především na těžších, nadměrně vlhkých půdách se může objevit askochytová listová skvrnitost a odumírání výhonů, které jsou způsobeny houbou *Ascochyta phlogis*. Tento patogen způsobuje žloutnutí a odumírání výhonů. Na listech se tvoří protažené či nepravidelné šedivé, od středu blednoucí skvrny. Ve vybělené části na líci listů se později objevují černé pyknidy, díky kterým spolehlivě rozeznáme, že původcem není háďátko (Anonym 1, 2017).

Další houbové onemocnění projevující se na listech je septoriová listová skvrnitost (*Septoria phlogis*). Na listech jsou viditelné okrouhlé, antokyanové skvrny s difuzním

okrajem a často tečkovitě vyběleným středem. Postižené výhony je nutné na podzim odstranit a ostříhat těsně nad povrchem půdy. K ochraně proti askochytové i septoriové skvrnitosti se aplikují fungicidy (např. Dithane M 45, Polyram WG či přípravky na bázi mědi).

Za vyšší vlhkosti se na listech mohou objevit skvrny připomínající popálení slunečními paprsky či postřikem. Jsou nepravidelně rozmístěné, vybledlé, okrouhlé a téměř jeden centimetr velké. Původcem těchto skvrn je houba *Stemphylium drummondii*, která je přenosná osivem.

Plamenky jsou též hostitelem houby *Verticillium albo-atrum*. Patogen proniká z půdy drobnými rankami do kořenů a cévních svazků, kterými prorůstá až k vrcholu. Napadení se projevuje často jen na polovině stonku. Listy od báze postupně žloutnou, v pokročilém stadiu od okrajů hnědnou, vadnou a svinují se. Postupně odumírají nejen listy, ale i stonky slábnou a počet výhonů v trsu se snižuje, až postupně celá rostlina uhynie. Napadené rostliny je nutné i s velkým objemem půdy vyjmout, zničit a na daném stanovišti přerušit pěstování alespoň na pět let. Kromě houbových patogenů bylo u plamének zaznamenáno i napadení viry a fytoplazmami (Anonym 1, 2017).

Mimo výše zmíněných patogenů mohou plamenky napadat i někteří škůdci, největším problémem je výskyt háďátek. U těch je nejdůležitější prevence, kterou představuje především nezamořená půda. Typickým příznakem napadení háďátkem jsou sklovitě oddělitelné stonky, deformované a odlišně zbarvené listy (Böhm, 1991). Ochrana u tohoto škůdce je velmi problematická, doporučuje se napadené rostliny ihned vyjmout z půdy, spálit a na zamořených záhonech již plamenky nepěstovat (Böhm, 1991). Jinou možností ochrany před tímto velmi drobným škůdcem je v jejich těsné blízkosti výsadba aksamitníků, které háďátka velmi silně odpuzují (Anonym 3, 2017).

3.3.2 Množení

U zahradních odrůd plamének používáme několik způsobů převážně vegetativního rozmnožování. Množí se hlavně dělením silnějších trsů, ale také vrcholovými a kořenovými řízků v jarních měsících, jakmile výhonky dosáhnou délky asi 20 cm (Böhm, 1991).

Při vegetativním množení musíme dávat pozor na zdravotní stav rostlin. Hlavně nesmí být napadeny háďátky, které se nejčastěji vyskytují v bázi starých stonků. Musíme dát pozor také na choroby jako je například septorióza nebo verticilóza (Golovkin a kol., 1986).

Výše zmíněné užívané metody mají poměrně nízký množitelský koeficient, proto soustavně probíhá výzkum týkající se rozmnožování pomocí explantátových kultur *in vitro*,

při kterých by byla větší výtěžnost napěstovaných rostlin (Konopíková, 2016). Tato metoda je velkým přínosem pro získání bezvirózního materiálu a eliminaci všech chorob a škůdců. Technologie spočívá v pěstování rostlinných segmentů na živném médiu, kdy se rostliny udržují ve sterilních podmínkách, aby nedošlo ke kontaminaci různými houbami a bakteriemi. Kvůli tomu se využívá uzavřených skleněných či plastových nádob, do kterých se části rostlin umísťují ve speciálním boxu s proudícím filtrovaným vzduchem (*flow-box*). Explantát se po sterilizaci a preparaci umístí na médium s přidavkem fytohormonů. Toto médium podporuje regeneraci nových pletiv. Po zakořenění v médiu dochází k převodu do nesterilního substrátu a přípravě rostlin pro venkovní výsadbu (Matiska, 2006).

3.3.3 Historie šlechtění plamenek

Plamenka byla objevena v roce 1700 a v roce 1732 se dostala do Evropy, kde se jí nejdříve věnoval šlechtitel P. L. V. Lemoine. Pod názvem *Phlox paniculata* jsou uváděny četné zahradní formy a kultivary vzniklé mezidruhovým křížením s původním druhem plamenky (Golovkin kol., 1986). Nejvíce odrůd plamenky latnaté bylo vyšlechtěno prvních padesát let minulého století šlechtiteli v SRN a Holandsku, například K. Foersterem, G. Arendsem, Ruyssem a dalšími. V mnoha případech se zároveň přidružila k barvám květů i typická velice příjemná vůně (Böhm, 1991). Podle doby kvetení se plamenky dělí do tří skupin: rané kvetou v první polovině června, střední začínají kvést ve druhé polovině července a pozdní vykvétají v druhé polovině srpna (Golovkin a kol., 1986).

Z mnoha kultivarů se pěstuje například: odrůda 'Frauenlob' se světle růžovými květy, odrůda 'Wurtembergia' s karmínově růžovými květy, odrůda 'Áida' s květy karmínově červenými, odrůda 'Landhochzeit' se svěže růžovými květy, odrůda 'Spitfire' s lososově červenými květy s tmavým očkem (Böhm, 1991), odrůda 'Starfire' s květy svítivě červenými a s tmavým listem, odrůda 'Orange' s květy svítivě oranžově červenými a mnoho dalších odrůd (Golovkin a kol., 1986).

3.4 In vitro kultury

In vitro je odborný termín, používaný v medicíně, biologii a dalších příbuzných oborech pracujících s organizmy a jejich částmi v umělých podmínkách laboratoře, který se z latiny překládá jako „ve skle“. V přeneseném slova smyslu, to pak znamená ve zkumavce, *Erlenmeyerově baňce* nebo v *Petriho miskách* a případně také v dalším laboratorním skle, kde

lze něco pěstovat či kultivovat. V dnešní době, kdy se ke kultivaci využívají i jiné nádoby než skleněné (většinou plastové) stále hovoříme o pěstování v *in vitro* podmínkách. Opakem výrazu *in vitro* je *ex vitro*.

Při přenesení z podmínek *in vitro* do *ex vitro* se rostliny musí potýkat se značným stresem. Mikropropagace rostlin představuje soubor technik *in vitro*, jejichž cílem je rychlé namnožení (naklonování) rostlinného materiálu. Nejběžnějšími technikami kultivace organizovaných buněčných struktur v podmínkách *in vitro* jsou organogeneze a embryogeneze (Šebánek a Sladký, 1988).

3.4.1 Regenerační schopnosti rostlin

Termín regenerace označuje jak proces opravy poškozených tkání, tak i nahrazení ztracených tkání, orgánů a končetin. U rostlin je regenerace zprostředkována pomocí dělivých pletiv na rozdíl od živočichů, kde jsou tkáňové buněčné diference obecně ireverzibilní (Novák, 1990). Je možné rozlišovat dva druhy regenerace: fyziologickou a reparativní regeneraci. První termín označuje běžnou obnovu tkání jejich dělením, druhý termín znamená nahrazení ztracených částí těla (Rosypal, 2003).

Regenerační schopnosti rostlin a živočichů se tak zásadně liší, je to dáno i jinou stavbou rostlinné a živočišné buňky. U živočichů jsou buněčné a tkáňové diference obecně ireverzibilní, u rostlin však existuje schopnost přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristematického stavu, který je charakterizován intenzivním buněčným dělením a následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů a následně i celých rostlin. Rostlinná somatická buňka je takzvaně plně totipotentní (schopnost regenerace), to znamená, že obsahuje kompletní genetickou informaci ke stavbě a vývoji celého organismu (D'Amato 1977). Za určitých podmínek, které mohou být v *in vitro* podmínkách definovány a kontrolovány, dojde při morfologických procesech k regeneraci celých rostlin. Diference rostlin v podmínkách *in vitro* probíhá v několika systémech:

1. Organizované struktury-meristémy a zygotická embrya
2. Diferencovaná pletiva a komplexy pletiv
3. Pletiva na různém stupni dediference, a to zejména ve formě kalusu
4. Izolované buňky a protoplasty

Morfogeneze každého uvedeného systému má své určité specifické vlastnosti, které se odrážejí při fyziologické regulaci i při geneticky determinovaných vývojových procesech (Novák, 1990).

U vyšších rostlin jsou v určitých oblastech trvale přítomny nediferencované (meristemické) buňky s obdobnou strukturou a funkcí jako buňky vyvíjejícího se embrya. D'Amato (1977) definuje vyšší rostliny jako organismy s kontinuální embryogenezí nebo rekurentní ontogenezí. Lokalizace iniciál do vzrostlého vrcholu stonku od sebe znemožňuje oddělit buňky podílející se ve stonkovém vrcholu na tvorbě vegetativních orgánů od buněk tzv. zárodečné linie, které při přechodu do reprodukční fáze vývoje organismu vytvářejí sporogenní pletivo a po proběhlé meiotické redukci gamety. S tvorbou reprodukčních orgánů souvisí mimo jiné vlastnost apikálního meristému, totiž vysoce geneticky stabilní struktura zaručující diploidní charakter reprodukce jedince a tím genetickou kontinuitu (Novák, 1990). Díky přítomnosti organických látek v médiu, které mají nejen různé regulační účinky, ale jsou i zdrojem uhlíkaté výživy a energie, je umožněno zmenšování rozměrů izolovaných částí rostlin. Není tedy potřeba, aby si nesly zásobní látky pro uskutečnění procesů sebou. Části izolovaných rostlin za účelem kultivace se nazývají explantáty, celkově se tato problematika nazývá explantátové kultury (nebo také nevhodně tkáňové kultury).

Explantáty mohou být spory, nezralé a zralé zárodky, ale i semena, orgány, pletiva, jednotlivé buňky i buňky zbavené buněčných stěn-protoplasty.

Na explantáty nemají vliv jen živná média, ale i další faktory jako světlo, teplota i plynná složka kultivačního prostředí.

Po umístění explantátu do kultivačních podmínek nastávají tyto reakce:

- A. Reakce na poranění
- B. Reakce na ztrátu vlivu celistvé rostliny
- C. Reakce na kultivační podmínky

Pořadí těchto aspektů, jak je uvedeno, je na počátku kultivace, ale velmi záhy dochází ke kombinacím a je těžké určit, co je příčinou určitého projevu, jenž v explantátové kultuře probíhá (Procházka a kol., 1998).

3.4.2 Typy reakcí explantátů v kultuře in vitro

Po umístění explantátů může dojít k několika jevům:

1. Různě rychlé odumření
2. Dlouhodobé přežívání beze změn, někdy se zvětšuje objem
3. Pokračování původního vývoje (časté u kořenů)
4. Další vývoj struktur, které byly založeny před izolací

Až po izolaci explantátu dochází ke vzniku základů struktur a začíná se tvořit kalus (neorganizované pletivo). Kalus může při přenášení na čerstvé kultivační médium a odstraňování odumřelých buněk přežít řadu let. K jakým konkrétním jevům v kultuře *in vitro* dojde, záleží na řadě jevů, dle Murashige (1974), George a Sherringtona (1984) se jedná o tyto faktory:

- A. Orgán, ze kterého byl explantát izolován
- B. Fyziologické a ontogenetické stadium
- C. Období odběru explantátu
- D. Kvalita donorové rostliny
- E. Genotyp
- F. Velikost explantátu
- G. Orientace explantátu
- H. Předchozí působení na donorovou rostlinu
- I. Inokulační hustota

Za jeden z nejdůležitějších faktorů se považuje genotyp, roli však hrají i morfologické a fyziologické zákonitosti (Procházka a kol., 1998).

3.4.3 Totipotence, dediferenciace, diferenciaci, apoptóza

Základním předpokladem regenerace je totipotence, jedná se o schopnost jedné rostlinné buňky dát vznik celému rostlinnému organismu. Od konceptu totipotence se odvíjí celá historie explantátových kultur (Šebánek, Sladký, 1988).

Nejtypičtěji se tato vlastnost projevuje u zygoty, jež v sobě obsahuje genetické informace pro celý organismus. Diferenciace nesmí dosáhnout takového stupně, aby byla ztracena nebo ireverzibilně inaktivována část genetické informace, která umožňuje právě vznik jedince ze zygoty. Tuto vlastnost mají buňky meristému a embrya s minimálním stupněm diferenciaci. Některé buňky však tuto vlastnost ztratili, jako například vodivé buňky v lýku, které jsou bezjaderné. U jiných buněk je totipotence špatně určitelná v důsledku vysokého stupně diference nebo se pouze nepodařilo zjistit podmínky aktivace. Tato zjištění potvrzují výsledky, kdy se podařilo i z vysoce specializovaných buněk pokožky získat základy celé rostliny. Každopádně základem je dediferenciace na funkční úroveň zygoty, buňky embryonální nebo meristemické. Zjednodušují se buněčné organely a obnovuje se dělení. Je však nutné, aby bylo dělení přísně organizované a byla nastolena buněčná a

orgánová polarita, pokud nejsou tyto podmínky splněny, vznikne kalus. Důležité je i programové odumírání buněk (apoptóza) podle určitého programu. Proces dediferenciace není omezen pouze na explantátové kultury, dochází k němu i v celistvé rostlině při vzniku sekundárních meristémů (Procházka a kol., 1998).

3.4.4 Regenerace ze založených základů a regenerace de novo

V umělých podmínkách mohou různé struktury regenerovat ze základů z původních (donorových) rostlin. V explantátových kulturách se tento typ regenerace nazývá jako regenerace ze založených základů (za běžných podmínek pouze regenerace). Z takových základů však ne vždy vznikne celá rostlina (mohou například vznikat pouze jednotlivé orgány z meristémů). Jestliže se samotné základy vytvářejí teprve během kultivace, hovoříme o regeneraci de novo, v normálních podmínkách *in vivo* opět hovoříme o vlastní regeneraci (Procházka a kol., 1998).

3.4.5 Regenerace přímá a nepřímá

Jak již je zmíněno výše, k regeneraci může docházet přímo na izolovaném pletivu ze založených základů nebo de novo z dediferencovaných buněk, které začnou vytvářet nové struktury. Oba dva příklady představují přímou regeneraci.

O regeneraci nepřímé hovoříme v případě, kdy se dělení meristemických buněk spolu s explantátem nebo vzniklých dediferenciací přetvořilo nejprve v kalus a až následně většinou po změně kultivačních podmínek došlo k regeneraci nových struktur. Mezi původní organizovanou strukturou explantátu a nově vzniklou strukturou je kalusové stadium (Procházka a kol., 1998).

3.4.6 Kultury organizovaných buněčných struktur (meristémové kultury)

Při vegetativním množení intaktních rostlinných částí, organizovaných buněčných částí, organizovaných buněčných struktur (meristémů a embryí), tedy klonováním v *in vitro* podmínkách lze namnožit rostliny při zachování jejich žádoucích vlastností na rozdíl od somatické organogeneze, která je spojena s genetickou nestabilitou a neorganizovaným růstem v *in vitro* podmínkách typickým pro kalusové a buněčné kultury, čehož lze využít při šlechtění rostlin. U meristémové kultury tak dochází ke genetické stabilitě a identitě s

matečnou rostlinou (Šebánek a Sladký, 1988). Jedná se tak o klonové množení, kdy potomstvo vzniká nepohlavní cestou a je genotypově i fenotypově uniformní.

Typickou vlastností růstu a diferenciaci vyšších rostlin je primární lokalizace těchto procesů do apikálních meristémů na kořenovém a stonkovém pólu. U vyšších rostlin jsou stále přítomny nediferencované meristemické buňky, které mají obdobnou strukturu a funkci jako buňky vyvíjející se z embrya. Rostliny jsou tak definovány jako vyšší rostliny s kontinuální embryogenezí nebo rekurentní ontogenezí. Z genetického hlediska je akceptována představa tří histogéních zón apikálního meristému: vrstva L_I (původ z tuniky-jedna nebo více vrstev buněk) a vrstvy L_{II} a L_{III} (původ z korpusu-pletivo obklopené tunikou), tato koncepce je důležitá zejména při popisu genetického chimérismu. Řada autorů pozorovala v oblasti meristémů takzvanou klidovou oblast, klidové centrum je typické pro oblast jak kořenového, tak i stonkového vrcholu a je pravděpodobně místem vysoké metabolické aktivity biosyntézy fytohormonů (Novák, 1990).

3.4.7 Meristémy (dělivá pletiva)

Meristémy nebo také pletiva dělivá zajišťují produkci nových buněk a zároveň i růst celých rostlin. Růst je u rostlin lokalizován do relativně malé ohraničené oblasti a nedochází tak k difúznímu růstu ve všech částech, jak tomu je u živočichů. Růst rostlin je tak neomezený a neukončený, to znamená, že rostliny jsou schopné mít stále plně funkční všechny orgány a současně neomezeně dále růst. Tohoto faktu využíváme při pěstování explantátových kultur *in vitro* podmínkách. Rostliny si touto vlastností kompenzují nevýhodu v podobě nemožnosti vlastního pohybu, jak jsou tomu schopní živočichové. Díky tomu jsou rostliny schopné prokořenit do lepší orniční vrstvy s dostatkem živin nebo dorůst za lepšími světelnými podmínkami. Orientují se vůči zemské gravitaci. Existence meristémů je i příčinou vývojové plasticity rostlinných organismů a jejich schopnosti reagovat růstovými změnami na působení vnějších faktorů. Meristémy jsou soubory odlišných buněk, které jsou specializované k intenzivnímu buněčnému dělení směřujícímu ke vzniku určitého pravidelného vzoru. To je hlavní odlišovací znak od neorganizovaně se dělících shluků buněk, které vznikají například při hojení ran nebo jako kalusy. Buňky v meristémech, které se opakovaně dělí, nazýváme iniciály, když dojde k dělení iniciály, vzniknou dvě dceřiné buňky, z nichž jedna vzejde jako další iniciála a z druhé vznikne derivát nebo také odvozená buňka. Odvozené buňky se dělí v blízkosti vzrostlého vrcholu a kořenové špičky pouze při probíhající diferenciaci. Z toho vyplývá, že se deriváty iniciály dělí jen po omezenou dobu, při níž dochází k různým

změnám, které naznačují budoucí specializaci. Při dokončení dělení dojde k ukončení procesů přeměny a vznikají buňky trvalých pletiv.

Buňky meristemických pletiv jsou zpravidla jednoduché tenkostěnné parenchymatické buňky s velkými jádry a hustou cytoplazmou. Mají schopnost se neustále dělit a jinou činnost obvykle nevykonávají.

Nejčastěji jsou meristémy klasifikovány podle jejich lokalizace v organismu. Apikální meristémy se vyskytují ve vrcholech prýtu a kořene, laterální meristémy jsou uspořádány na periferiích orgánů paralelně na stranách s osou orgánu a označujeme je jako meristémy sekundárního růstu neboli druhotného tloušťnutí rostlinných orgánů. Najdeme je obvykle v kořeni a stonku a vyskytují se pouze u těch typů rostlin, u nichž tento růst existuje. Kambium a felogen jsou laterální meristémy. Interkalární meristémy jsou vmezeřeny již mezi trvalá pletiva a na rozdíl od výše zmíněných neobsahují iniciály. Dále ještě mohou být rozlišovány bazální meristémy lokalizovány na bázi orgánů, které se uplatňují při růstu listů a marginální meristémy, které nalezneme na okraji orgánu, a též se nejčastěji uplatňují při růstu listů (Novák, Skalický, 2009).

Z hlediska meristemického vývoje je zajímavostí diferenciací listů. Při vývoji listů a jeho postavení na stonku (fyloxy) dochází nejčastěji ke spirálovité fyloxy, při které má pomyslná křivka spojující listová primordia tvar spirály, jenž se nazývá spirála genetická či vývojová. V určité fázi vývoje je listové primordium natolik determinováno, že se po jeho přesazení do podmínek *in vitro* vytvoří list (Procházka a kol., 1998).

3.4.8 Organogeneze

Buňky trvalých pletiv explantátu pocházející z intaktní rostliny se v kontaktu s kultivačním médiem vhodného hormonálního složení začínají po určité adaptační fázi dělit. Popisují se tři stadia vývoje: 1. Indukce růstu, 2. začátek buněčného dělení, 3. cytodiferenciací (Novák, 1990). Nevzniká však bezprostředně celistvá rostlina, v mnoha případech je k ní však možné dospět dalšími manipulacemi, a to změnou kultivačních podmínek nebo přenesením do normálních podmínek. Na průběh ontogeneze mají vliv kultivační podmínky, a především složení kultivačního média. Ze složek kultivačního média se významně uplatňují růstové látky. Při organogenezi platí pravidla, která zjistili Skoog a Miller (1957). Podle tohoto pravidla se uplatňují rozmezí ve fyziologické koncentraci v poměru mezi auxiny a cytokininy. Pokud převažují cytokininy nad auxiny, dochází k regeneraci pupenů a prýtlů, pokud převažují auxiny, dochází k regeneraci kořenů. Je-li koncentrace cytokininů a auxinů přibližně stejná,

dochází u primárních explantátů ke tvorbě kalusu. Kalusová kultura pokračuje normálně ve svém růstu, aniž by docházelo k regeneraci. Toto pravidlo má však řadu vyjímek (Procházka a kol. 1998).

První dva až tři mitotické cykly se na počátku vzniku kalusového pletiva vyznačují vysokým stupněm synchronizace, která se však se stářím kultury progresivně snižuje. V pozdějším průběhu neorganizovaného růstu *in vitro* je kalusové pletivo složeno převážně z buněk parenchymatického typu. Zároveň je typická přítomnost tracheálních elementů vzniklých v procesu cytodiferenciace, případně dalších komponent, jako je například prokambium, dřev a lýková část (Novák, 1990). Látka auxinové povahy s velmi silným účinkem velmi často indukuje tvorbu kalusu i při odpovídajícím poměru s cytokininem, zde se uplatňuje aktivita dané látky na místo koncentrace. Tak je tomu v případě izolovaných apikálních či axilárních meristémů, u kterých cytokinin potlačuje apikální dominanci, a tak vyvolává okamžitou tvorbu postranního větvení z právě založených axilárních meristémů. U založení explantátů z kořenů se uplatňují obdobné zákonitosti jako u řízků.

Organogenezi tak může v podstatě vzniknout jakýkoliv orgán rostliny jako například kořen, prýt, list, květ. Zásobní orgány (např. cibule, hlízy) vznikají v podmínkách *in vitro* na bázi regenerovaných prýtů, nebo bezprostředně na kultivovaném explantátu – segmentu zásobního listu z cibule, normálního listu, prýtu, květenství, někdy i pestíku. Většinou se tak jedná o regeneraci přímou. Nelze si však představit že se jedná o plnohodnotné hlízy či cibule vzniklé v přírodních podmínkách, hovoříme zde spíše jako o cibulkách a mikrohlízkách. I tak mají tyto zásobní orgány význam, protože se s nimi pracuje jako s normálními cibulemi a usnadňují tak převod do normálních podmínek *ex vivo* (Procházka a kol., 1998).

Mitotický index parenchymatických buněk kalusového pletiva je velmi nízký a pohybuje se v řádech desetin procent až maximálně 5 % podle použitého materiálu a stáří kultury. Uvnitř kalusového parenchymu vznikají okrsky buněk s částečnou synchronizací a frekvence mitóz kolísá v průběhu kultivačního intervalu. Pokud diferencované buňky revertují do meristemického stavu a vytvářejí neorganizovaný kalus lze hovořit o dediferenciaci. Mnohobuněčný explantát je většinou tvořen buňkami pletiv různého typu. Výsledkem dediferenciace je vytvoření heterogenního systému z hlediska jeho schopnosti zpětné diferenciaci v organizovanou strukturu a v konečném důsledku i celou rostlinu. I když všechny buňky explantátu obsahují funkční jádro a můžeme je považovat za totipotentní, ne vždy jsou všechny tyto buňky morfologicky kompletní. Je tedy důležité vybrat vhodný explantát, který determinuje morfogenetickou odezvu při kultivaci *in vitro*. Explantátovou kulturu, jako kalusové pletivo, tak i buněčnou suspenzi musíme považovat za nestejnorodý

system složený z buněk různého stupně diferenciace s různou morfogenetickou kompetencí a různou reakcí na morfogenní exogenní signál. Organogeneze může být vyvolána jak v kalusové kultuře, tak i v buněčné suspenzi. Kořenové a stonkové meristemoidy se zakládají v kalusovém pletivě nezávisle. Obecný model regenerace rostlin *in vitro* vyžaduje regeneraci prýtlů na cytokininovém médiu a ve druhém stupni jejich zakořenění na auxinovém médiu. Organogeneze může vycházet z jediné somatické buňky, avšak častěji jsou případy diferenciace meristemoidů z několika vzájemně prostorově komunikujících buněk (nejčastěji ze tří nebo i více).

Je třeba zdůraznit, že organogenetická a embryogenetická kompetence se realizuje na různé strukturální úrovni. Jediná buňka tak může být organogeneticky kompletní a stát se tak základem buněčného komplexu. Úvahy o jednobuněčném původu jsou významné ze šlechtitelského hlediska, protože při regeneraci organogenezí je častý výskyt genetických a chromozomálních chimér. Získání nechimérických mutantů pak vyžaduje další generace potomstev regenerovaných rostlin (Novák, 1990).

3.4.9 Embryogeneze in vitro

V normálních podmínkách představuje embryogeneze proces, při kterém postupnými strukturálními změnami vzniká z jedné buňky zárodek. První uvedenou buňkou nejčastěji bývá zygota, která vzniká splynutím samčí a samičí pohlavní buňky. Dělením zygoty se přes různá stadia vyvíjí dospělý zárodek, který je následně uložen v semeni. Při případném vyklíčení semena poté vzniká celistvá rostlina. Průběh embryogeneze není u všech rostlin stejný, výrazně se od sebe odlišují krytosemenné a nahosemenné rostliny, ale i v rámci skupin rostlin nalezneme rozdílnosti. Základem embrya nemusí být vždy pouze zygota, zárodky se mohou vyvíjet i apomikticky, to znamená, že nedošlo ke klasickému oplození.

Proces samotné embryogeneze má opět svůj počátek v jedné buňce, ale tou nemusí být vždy pouze zygota, častou onou jedinou buňkou může být některá z haploidních buněk gametofytu (u krytosemenných rostlin například buňka zárodečného vaku). Takto vzniklý zárodek je haploidní (Procházka a kol., 1998). Diploidní zárodky mohou bez oplození vznikat z buňky nucellu nebo vaječných obalů (diploidní somatické buňky).

V umělých podmínkách kultivace se mohou zárodky vyvíjet všemi uvedenými způsoby. Embrya vyvíjející se v *in vitro* podmínkách můžeme rozlišit na:

- Embryogenezi zygotickou
- Embryogenezi gametofytickou

- Embryogenezi somatickou
- Somatickou polyembryogenezi

3.4.10 Embryogeneze zygotická

Základem při vývoji této embryogeneze, jak již vyplývá z názvu, je zygota, ta může vznikat před i po izolaci explantátu. Je lepší kultivovat celý květ nebo jeho části na místo embrya vyvíjejícího se semena. Kultivovaná pletiva tak plní vyživovací a ochrannou funkci. Pokud je žádoucí odstranit vliv mateřské rostliny, je vhodná kultivace vyvíjejícího se semena. Čím je však zárodek méně vyvinutý, tím složitější médium musí být, co se látkového složení týče, užitečné mohou být i nedefinované směsi jako například kvasniční extrakt, kokosové mléko nebo kasein. Dalším důležitým vlivem je vysoká osmotická hodnota média. Pokročilým vývojovým stádiím, která nazýváme kultury izolovaných embryí nebo embryokultury stačí často ztužený roztok sacharózy s agarem (Procházka a kol., 1998).

3.4.11 Embryogeneze gametofytická

Embryogenezi lze v *in vitro* podmínkách vyvolat i z některých buněk gametofytu. U semenných rostlin podle typu gametofytu rozlišujeme gynogenezi a androgenezi. Naprostá většina poznatků o gametofytické embryogenezi byla zjištěna u krytosemenných rostlin. Dle analýzy se zjistilo, že při gynogenezi se jedná o haploidní rostliny, které vznikly z haploidních buněk zárodečného vaku. Nemusí se však vždy jednat o buňku vaječnou, ale i synergidy, při srovnání s celou rostlinou se jedná o apomixii (genetická identita s výchozí rostlinou). Ke gynogenezi dochází jen v omezeném množství kultivovaných explantátů a někdy může dojít pouze ke vzniku kalusu, u kterého je však možné vyvolat regeneraci (Procházka a kol., 1998). Dalším druhem apomixie je androgeneze, od gynogeneze se liší původem vzniku, zde se jedná o samčí pohlavní buňky-pylové prašníky. Při androgenezi se v prašnicích umístěných do umělých podmínek vyvíjejí z pylových zrn haploidní zárodky. Dochází k dělení, které je známé ze zygotické embryogeneze. Zárodek, ze kterého se vyvíjí rostlinka je haploidní. Vznik haploidních a případně spontánně dihaploidních zárodků je důležitý pro šlechtitelskou praxi, velkou roli zde hraje genotyp. Bylo zjištěno, že průběh vnějších podmínek může silně ovlivnit vývoj vzniku zárodků. Například u lipnicovitých má vliv snížená teplota, u jiných rostlin je to naopak zvýšená teplota. Dalšími faktory může být snížený atmosférický tlak, osmotické šoky, zvýšená koncentrace oxidu uhličitého a dusíkatá výživa. Obecně se dá říci, že na androgenezi

působí extrémní podmínky. Vliv má i použité médium, v některých případech je vhodnější tekuté médium, ve kterém vzniká izolace pylových zrn přímo do média, mnohem méně se osvědčila mechanická izolace. Dalším faktorem na průběh androgeneze mají cukry a působení růstových látek. Na průběh androgeneze mají vliv i samotná pletiva prašníků, která mohou svým metabolismem pozměnit vliv kultivačního média a mohou obsahovat i inhibiční látky. Pokud se pylová embrya dostatečně vyvinou, vznikají mladé rostlinky, někdy je však pro dokončení vývoje zapotřebí působení například cytokininu, protože se objevují odchylky od normálních zygotických zárodků.

Ne vždy se vyvíjí z pylových zrn rostlinky přímo, ale může dojít k nepřímé regeneraci přes vznik kalusového pletiva. Buňky kalusu jsou zpočátku haploidní a ke změně ploidie dochází postupně. Rostlinky tak mohou z kalusů vznikat vyvoláním organogeneze nebo z některých buněk kalusu začne probíhat embryogeneze (Procházka a kol., 1998).

3.4.12 Embryogeneze somatická

Základem je vznik zárodku z buněk somatických, nikoliv ze zygoty nebo buněk gametofytu. Jinak řečeno, jedná se o adventivní nebo také asexuální vývoj zárodku z buňky, která nevzniká z gametické fúze. Tento způsob vývoje je znám u celé řady druhů, kdy se embrya vyvíjejí v *in situ*, nejčastěji z nucelárních buněk nebo buněk suspenzoru a integumentů společně se zygotickými zárodky. *In vivo* adventivní (somatická) embryogeneze je obecně omezena jen na vývoj pletiva semeníku, ostatní diferencované somatické buňky tuto vlastnost mohou projevit pouze v kultuře *in vitro* (Novák, 1990).

Průběh vzniku zárodků v *in vitro* podmínkách nemusí být přesně stejný jako u zygotické embryogeneze, objevují se však dva společné rysy pro všechny zárodky: 1. jednotlivé buňky mají na počátku vývoje typický protoplast s hustou cytoplazmou a aktivním dělením vytvářejí skupiny embryogenních buněk, 2. všechny vyvíjející se zárodky pronikají do zárodečného vaku stejným způsobem. Mezi takto vzniklými zárodky a zárodky zygotickými neexistují zásadní rozdíly, bylo však zaznamenáno nevytvoření typického suspenzoru a vznik zárodku i z buněk listů (u orchideje). Základem k somatické embryogenezi mohou být i buňky zygotického embrya v rámci určitých stádiích vývoje po jeho poškození chemickým nebo fyzikálním působením. Při menším poškození dojde ke vzniku četných děloh, při větším poškození k rozštěpení a vzniku dvou embryí, a vzniku zárodků z buněk suspenzoru. U nahosemenných rostlin často dochází ke štěpení bez vnějších příčin. Na rozdíl od zygotické a gametofytické embryogeneze se jedná o regeneraci nepřímou,

kdy vznik somatických embryí vyvíjejících se přímo na diferencovaných pletivech bez tvorby kalusů je podstatně méně četný. K přímé regeneraci lze zařadit i sekundární somatickou embryogenezi, kdy nová embrya vznikají z pokožkových buněk embryí, která předtím vznikla také ze somatické embryogeneze. Tento proces polyembryogeneze probíhá bez tvorby kalusů. Průběh samotné embryogeneze lze rozdělit do několika hlavních fází: Indukce, vývoj embryí, jejich zrání a klíčení.

Indukce představuje fázi, kdy somatická buňka získá stejné vlastnosti jako zygota, některé buňky potřebují umístění na jednoduché živné médium, jiné buňky potřebují složitější kultivační zásahy s aplikací auxinů (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová). Mohou však nastat i určité nepravidelnosti, protože kultivační podmínky neodpovídají podmínkám ve vyvíjejícím se semeni. Vývoj někdy nemusí od začátku probíhat přes organizované struktury, ale přes takzvaný proembryonální komplex a teprve poté probíhá další vývoj a vznik rostlin. Výhodou je absence vzniku chimér, které často vznikají při organogenezi.

Somatická embryogeneze je především silně ovlivněna kultivačním médiem a velká pozornost byla věnována zásobování dusíkem, kladný vliv byl zjištěn u amoniakových iontů a především u aminokyselin (zvláště prolin). Podobně jako u androgenese mohou být významné i ionty železa. Další vliv na vývoj somatických embryí má i osmotická hodnota kultivačního média, zajišťována sacharózou, inositem, manitem nebo sorbitolem.

Jak již bylo zmíněno, velmi důležitou roli hrají i růstové látky, vedle zmíněných auxinových látek je důležitá i přítomnost cytokininů. V pozdějším vývoji příznivě působí kyselina abscisová, zabraňuje totiž předčasnému klíčení a k následnému vývoji aberantních rostlin (Procházka a kol., 1998).

Samotná předpověď, že jediná rostlinná somatická buňka může vytvořit kompletní embryo, byla vyslovena již v roce 1902 Haberlandtem. Experimentálně však došlo k potvrzení tohoto faktu až o 50 let později. Potvrdila se tak myšlenka, že jediná somatická buňka je totipotentní. K vyjádření této schopnosti musí být buňka zbavena korelačních vlivů intaktního pletiva a vystavena podmínkám *in vitro*, které podnítl její diferenciaci ve strukturu stejného charakteru jako je zygotické pletivo. V současné době je respektován fakt, že proces embryogeneze je iniciován z jediné původní buňky. Základem embryogeneze je vytvoření proembryonálních shluků (PES), tato struktura je typická centrální buňkou s jedinou velkou vakuolou. Na médiu bez auxinů pokračuje v buněčném dělení a na povrchu se začne vyvíjet mnoho somatických embryí. Jedním z faktorů důležitých pro dovršení celého procesu je výběr vhodného explantátu (vhodnost konkrétního explantátu závisí na druhu rostliny). Platí obecná zásada, že nejvhodnější jsou mladá aktivně se dělící pletiva.

Přehled faktorů, které ovlivňují iniciaci, vývoj a diferenciaci somatických embryí dle Ammirato (1983):

1. původ explantátu
2. minerální složení kultivačního složení
3. růstové regulátory
4. cukry
5. fyzikální podmínky kultivace
6. plynná fáze uvnitř kultivační nádoby a konzistence kultivačního media (pevné, tekuté)
7. hustota buněčné suspenze

Embryogeneze je složitý proces, který podléhá zkoumání podmínek iniciace celého procesu, růstu a vývoje struktur, dozrávání embryí a vyklíčení somatických embryí v rostlinu (Novák, 1990).

3.4.13 Somatická polyembryogeneze

Tento typ embryogeneze je typický pro jehličnany. Za normálních podmínek má rané somatické embryo jehličnanů silně vyvinutý suspenzorový aparát a skupinu embryonálních buněk ze kterých v dalších fázích vzniká vlastní zárodek. Obdobně je tomu i v *in vitro* kultuře., kdy první raná somatická embrya vznikají při kultivaci nezralých nebo zralých zygotických embryí. V umělých podmínkách je tak umožněn další vývoj, ke kterému by za normálních podmínek nedošlo. Další raná embrya mohou vznikat i v dalších částech izolovaného zygotického embrya, například na dělohách nebo i na jehlicích klíčnicích rostlin. Další vývoj raných somatických embryí se liší od rostlin krytosemenných absencí kalusových buněk. Přítomné jsou tak jen organizované struktury raných somatických embryí, která mají stejné vlastnosti jako zygotická embrya. Tato somatická embrya se sama dále množí, byly zjištěny dva způsoby multiplikace, a to štěpení skupin embryonálních buněk a pučení, ke kterému dochází v oblasti tubulárních buněk a suspenzorů. Raná somatická embrya se takto množí opakovaně. Rychlost procesu je značná a probíhá za přítomnosti kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a cytokininu. Pro další vývoj raných somatických embryí je třeba změnit kultivační médium. Nejdříve se zvýší jeho osmotická hodnota a poté vlivem kyseliny abscisové pokračuje vývoj k plně vyvinutým embryím (Procházka a kol., 1998).

3.5 Genetické nestability v explantátových kulturách

Na explantátové kultury se jistou dobu pohlíželo jako na prostředek zachování genetické stability rostlin prostřednictvím klonového množení *in vitro*. Brzo se však tento názor změnil, protože se objevila řada nálezů odchylných typů rostlin regenerovaných v kalusových kulturách a buněčných strukturách. Bylo jasně dokázáno, že v průběhu kultivace došlo ke genetickým změnám somatických buněk. V tento moment bylo množení a ozdravování rostlin *in vitro* považováno za nevhodný způsob. Detailní výzkum odhalil, že o genetických změnách rozhoduje průběh morfogeneze, která závisí na výchozím explantátu a na diferenciaci kultury během kultivace.

Genetická variabilita somatických buněk *in vitro* se projevuje i u rostlin regenerovaných *in vitro*, tento jev má zásadní význam pro šlechtění rostlin. Je diskutován z hlediska chromozomálních změn a somaklonální variability regenerantů *in vitro*.

Metodologie explantátových kultur skýtá vedle možnosti zachycení spontánní genetické variability u regenerantů i vytvoření nových technologií mutačního šlechtění. Základem je indukce a selekce mutací (Novák, 1990).

3.6 Vybavení laboratoře pro biotechnologii rostlinných explantátů

Prostory pro kultivaci – například kultivační boxy, nebo speciální klimatizované místnosti, kde jsou udržovány specifické podmínky (teplota, vlhkost, světelné podmínky aj.).

Prostor a zařízení pro aseptickou manipulaci – autokláv, flow box, destilační přístroje, speciální myčka skla a laboratorních pomůcek.

Důležité jsou vhodné podmínky pro skladování čistého skla a veškerých laboratorních potřeb. V laboratoři jsou dále potřebná další vybavení jako jsou váhy, třepačky, odstředivky, pH metry, chladničky, mrazničky, mikrovlnná trouba, vařič, míchačky na rozpouštění agarů, lihové kahany, bakteriální filtry, pinzety, skalpely, nůžky, preparační jehly, korkovrty, stojany, podnosy, nádoby z umělé hmoty a další.

Po práci s rostlinami v *in vitro* je dále zapotřebí kultivační místnost pro jejich vývoj. Tato místnost by měla být vybavena regály se světelným zdrojem, klimatizační jednotkou, ventilátory pro lepší udržení teploty (mezi 20 až 28 °C, ideálně však kolem 25 °C) a příslušná čidla pro správné fungování regulace.

V případě, že potřebujeme konstantní podmínky kultivačního prostředí, používáme kultivační boxy (inkubátor). Tyto boxy jsou schopné regulovat rychlost průtoku vzduchu,

regulovat vlhkost, časovat fotoperiodicitu, regulovat vlhkost a regulovat intenzitu světla (Šebánek, Sladký, 1988).

3.6.1 Murashige et Skoog (MS) médium

Pro založení pokusů z explantátových kultur je důležitý zdroj živin. Jako tento zdroj živin nám poslouží živné médium složené z makroelementů, mikroelementů, vitamínů, sacharózy, rostliných hormonů a tuhnoucí složky pro pevné médium – agar, případně agarosa. Další složkou mohou být růstové nebo mutagenní látky a další doplňkové látky např. používané pro regulaci hodnoty pH, jedná se například o hydroxid draselný nebo kyselinu mravenčí.

Vlastní příprava media probíhá v laboratorních podmínkách, v našem případě jsme jako základní médium používali MS médium (Murashige, Skoog, 1962). Je velmi univerzální a bylo již mnohokrát úspěšně ověřeno, například Matiskou (2009).

3.6.2 Chemomutageny

Kolchicin ($C_{22}H_{25}NO_6$) se používá u několika rostlinných druhů ke vzniku polyploidních odrůd. Ačkoli je velmi efektivní pro tvorbu polyploidů, pro člověka je tato látka vysoce toxická (Tilden and Kenneth, 2011). Aplikace kolchicinu se již uplatnila u pěníšníku pro vznik kompaktnějších rostlin nebo u balzamíny pro vznik tetraploidních rostlin (Defiani et al., 2013). Hlavním účinkem kolchicinu je narušení tubulinu, a to vede k následným změnám přirozené imunity. Kolchicin má rozmanité inhibiční účinky na makrofágy, zahrnující inhibici proteinů. Podporuje také anti-fibrotické aktivity a má vliv i na funkce endotelu (Konopíková 2016).

Oryzalin ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$) je používán jako alternativa ke kolchicinu při tvorbě polyploidních odrůd. Oryzalin má stejný mechanismus působení jako kolchicin. Oproti kolchicinu byl shledán účinnějším, a navíc je méně toxický pro zvířata i lidský organismus, díky tomu je při aplikaci na rostlinné explantáty pro obsluhu laboratoře bezpečnější.

Dříve se oryzalin používal hlavně jako herbicid aplikovaný na traviny a jednoleté plevele. Herbicidní účinek oryzalinu spočívá v antimiotické činnosti, která je určená vazbou mezi tubulinem a dinitroanilinem, V současné době byl již oryzalin několikrát aplikován u řady rostlin pro navození ploidie a zlepšení jejich vlastností (lepší růst, větší květy, větší odolnost aj.). Jako nevýhoda při využití oryzalinu se ukázala horší zakořeňovací vlastnost rostlin po převedení do venkovních podmínek (Defiani et al., 2013).

3.6.3 Růstové látky

Kyselina indolyl – 3 – octová (IAA)

Jedná se nejspíš o nejvýznamnější přirozený auxin. Kyselina indolyl – 3 – octová je krystalická látka, dobře rozpustná v organických rozpouštědlech a vodném zásaditém prostředí, téměř nerozpustná v kyselé a neutrální oblasti vody. Vzniká v rostlinách v meristemických pletivech a rostoucích listech (Kutina 1988). Tato velmi nestálá, slabá organická kyselina lehce dekarboxyluje a je citlivá především na UV záření (Procházka a kol., 1997). Pokud ošetříme lodyžní úsek na apikálním pólu auxinem, dochází na tomto pólu k regeneraci kořenů. Opakem auxinů jsou antiauxiny (např. TIBA), kde při ošetření obdobného úseku na bazálním pólu dochází k tvorbě pupenů. Auxiny jako je například IAA tedy podporují tvorbu kořenů (Šebánek, Sladký 1988).

Thidiazuron (TDZ)

TDZ patří mezi aromatické deriváty močoviny. Hlavním účinkem tohoto cytokininu je stimulace buněčného dělení a je základním prvkem pro regenerační procesy v *in-vitro* kulturách. Cytokiny obecně mají vliv na určité reakce v buněčném cyklu, nejspíše i na stimulaci některých kináz. Jejich hlavní úlohou je však vliv na replikaci DNA v S fázi mitózy – zvyšují počet počátků replikace, tedy zkracují replikony a tudíž dochází k rychlejšímu přepisu DNA (Procházka a kol., 1998).

Změnou poměru koncentrací cytokininů a auxinů je možné ovlivňovat průběh regenerace. Jejich vyrovnaný poměr vede k tvorbě nediferencovaného pletiva (kalusu), nadbytek cytokininů vyvolává regeneraci prýtů, a naopak zvýšením hladiny auxinů docílíme regeneraci kořenů (Miller 1956).

3.7 Detekce ploidie

3.7.1 Polyploidní kultury a indukce polyploidie u *Phlox paniculata*

Polyploidní indukce hraje významnou roli v hybridizaci a zlepšení řady vlastností rostlin. Realizátoři výsadby a spotřebitelé vyžadují stále nové odrůdy vykazující lepší vlastnosti než odrůdy stávající. Polyploidie může pomoci při získání výchozího šlechtitelského materiálu a pro další křížení (Matiska, 2016). Rostliny přeměněné na polyploidy mají rozšířený genetický

potenciál, který při hybridizaci umožňuje vznik vyššího počtu variant. Polyploidní jedinci mohou mít vylepšené znaky jako větší a výraznější květy nebo lepší růstové vlastnosti (Konopíková, 2016).

Hlavním zdrojem při získávání proměnlivosti organismů jsou mutace. Šlechtitelé využívají spontánní i indukovanou mutagenézi pro vytvoření zdrojů variability nutných pro šlechtění rostlin. Systém mutačního šlechtění je závislý na aplikaci mutagenního záření a chemických mutagenů, které indukují bodové a chromozomální mutace. Velký potenciál pro vegetativně pěstované druhy představují indukované mutace, které mohou být základem pro vznik nových klonů a kultivarů. Systém *in vitro* má významné uplatnění pro mutační šlechtění při aplikaci fyzikálních a chemických mutagenů. Mutagen lze aplikovat přímo v kultuře *in vitro* na izolované vrcholy, zygotická embrya, pletivové explantáty, kalus, buněčnou a protoplastovou kulturu. Aplikace mutagenu na velmi malé jednotky složené většinou z meristematických buněk usnadňují penetraci mutagenů, zejména u chemických látek. Další výhodou při aplikaci tímto způsobem je zvýšena pravděpodobnost zásahu buňky mutagenem a snížení pravděpodobnosti chimérismu. Při všech procedurách aplikace mutagenů v podmínkách *in vitro* je žádoucí samotná předkultivace rostlinného materiálu. Dalším možným způsobem vzniku polyploidních buněk mohou být restituční mitózy, které mají souvislost s poruchou dělicího vřeténka. Tento proces může mít značný význam pro indukci polyploidního stavu kultury. Polyploidizace kultury může být navozena i fúzí jader. Tento proces probíhá ve dvoujaderných buňkách, které byly popsány u celé řady kultur (Novák, 1990).

Navození polyploidie bylo v dnešní době zkoumáno již na celé řadě užitkových i okrasných rostlin například u olivovníku (Ozair et al. (2014), ibišku (Contreras and Ruter, 2009), akácii (Lam et al., 2014), manioku jedlého (Carvalho et al. (2016), růže svraskalé (Allum et al. 2007), balzamíně (Defiani et al. 2013) a další. Účelem tohoto zkoumání je získání kompaktních rostlin, větších květů, vyšších výnosů, zvýšené odolnosti vůči chorobám a škůdcům, lepší rozmnožovací schopnosti aj. Pro umělé navození polyploidie je v současné době upřednostňována aplikace účinných látek cestou *in vitro*. Účinné látky jsou aplikovány přímo do kultivačního média (Eeckhaut et al. 2004) nebo jako vodní roztoky na nodální segmenty (Escandón et al. 2006). Mezi látky, které se k tomuto účelu používají a působí jako toxiny mitotického vřeténka patří: kolchicin, oryzalin, trifluralin nebo amiprofos-methyl (Hancock 1997, Hansen and Andersen, 1996).

U *phlox paniculata* jako u rostliny okrasné květem byla navozována tetraploidie za účelem získání nových odrůd, které jsou přizpůsobivější vůči prostředí, vykazují lepší

rezistenci vůči patogenům, vyznačují se bohatšími a většími květy a lze je použít pro další šlechtitelské křížení. Práce zabývající se zvyšováním ploidie u tohoto druhu jsou doposud ojedinělé. Matiska a Vejsadová (2009) zvyšovali ploidi u *Phlox paniculata* s využitím chemomutagenů kolchycinu a oryzalinu u diploidního kultivaru *Phlox paniculata* 'Fujiyama' syn. Fuji s využitím mikropropagačních technik. Jako primární explantáty u tohoto pokusu byly použity listy z rostlin pěstovaných šest měsíců ve skleníku. Pro indukci polyploidie byly použity chemomutageny kolchicin a oryzalin v různých koncentracích a byly testovány dvě metody ošetření explantátů (infiltrační metoda a máčecí metoda). Nejvyšší hodnoty frekvence tetraploidů, mixoploidů a efektivity polyploidizace byly zjištěny u explantátů ošetřených kolchicinem po dobu 24 hodin u máčecí metody. Koncentrace 10 μ M oryzalinu a 0,2 % kolchycinu po dobu 14 dní byly neúčinnější pro obdržení tetraploidů u infiltrační metody.

3.7.2 Měření obsahu chlorofylu v listech pomocí chlorofylmetru CCM-200

Měření obsahu chlorofylu pomocí přístroje CCM-200 patří k nedestruktivním metodám, to znamená, že při měření nedochází ke zničení rostlinného materiálu. U klasického postupu, například při měření na spektrofotometru musí být rostlinný vzorek od rostliny oddělen, extrahován v rozpouštědle a až posléze může dojít k samotnému měření.

Chlorofylmetr měří relativní koncentrace chlorofylů v rostlinném vzorku na základě rozdílné absorpce chlorofylů v živých listech při různých vlnových délkách viditelného světla. Chlorofyly mají dvě hlavní absorpční maxima, a to v červené a modré oblasti viditelného světla. Naopak minimální absorpce chlorofyly nastává v zelené oblasti spektra a při infračerveném záření (Návod k přístroji CCM-200). Pomocí interferenčních filtrů se změní rozdíl absorpcí listu při 670 a 750 nm (Šesták, Čatský, 1966) a obsah fotosynteticky aktivních pigmentů je stanovován jako hodnoty SPAD.

Měřicím čidlo o velikosti v průměru 1 cm, se přikládá na list. Každé jednotlivé měření trvá 2 až 3 sekundy. Detektory jsou 2 silikonové světelné diody s integrálními zesilovači pro měření absorpce a zdroj energie, který monitoruje teplotní kompenzaci. Teplotní rozsah měření chlorofylmetrem se pohybuje v rozmezí od 0 °C do 50 °C (Návod k přístroji CCM-200). Výsledkem je celkové chlorofylové spektrum, jednotlivé typy chlorofylů se nerozlišují.

3.7.3 Měření obsahu chlorofylů podle Porra

Dalším typem měření chlorofylů je metoda podle Porra, při této metodě měříme jednotlivé typy chlorofylů (a, b) a zjišťujeme i obsah karotenoidů. Stanovení chlorofylů dle Porra probíhá z vyseknutého terčíku listu pomocí korkovrtu. Každý terčík by měl mít plochu 0,5 cm². Součástí výřezu by neměly být cévy. Takto připravený terčík se posléze vloží do zkumavky s 1 ml dimethylformidu (DMF), přikryje se parafilmem a černou látkou a poté se nechá třepat na třepačce přes noc v digestoři. Druhý den se takto připravený extrakt přelije do spektrofotometrických kyvet a změří se absorbance při 480; 646,8; 663,8 a 710 nm.

Rovnice pro výpočet chlorofylu a:

$$Chl_a = 12 A_{663.8} - 3.11 A_{646.8}$$

Rovnice pro výpočet chlorofylu b:

$$Chl_b = 20.78 A_{646.8} - 4.88 A_{663.8}$$

Rovnice pro výpočet celkového chlorofylu:

$$Chl_{a+b} = 7.12 A_{663.8} - 17.67 A_{646.8}$$

Rovnice pro výpočet karotenoidů:

$$Car_{x+c} = \frac{1000 A_{480} - 1.12 Chl_a - 34.07 Chl_b}{245}$$

Výsledky všech rovnic jsou v mg.l⁻¹

Pro přepočítání nmol/ml: Chl a = vynásobit 1.118

Chl b = vynásobit 1.102

Do rovnic se dosazují hodnoty příslušných absorbancí zmenšené o A₇₁₀.

Příprava vzorků by se měla provádět v rukavicích a za rozptýleného světla. Je vhodné vzorky přikrýt černou látkou. Chlorofyl A_{663 (646)} má být v rozmezí 0,4-0,7 (toleruje se do 1), pokud se tolerance nesplní, je nutné ředit dimethylformidem (Porra a kol., 2001).

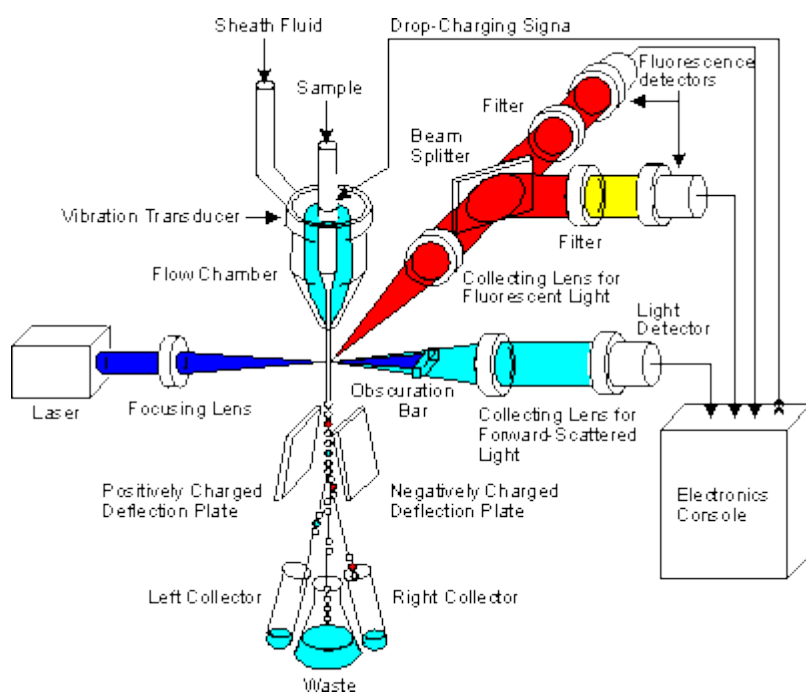
3.7.4 Měření a detekce ploidie pomocí průtokového cytometru

Průtoková cytometrie funguje na základě analýzy fluorescence látek a rozptýlu světla jednotlivých částic (například buňky, jádra, chromozomů) během jejich průchodu v úzkém a

přesně definovaném proudu kapaliny. Průtočná komora (tryska) je srdcem průtokového cytometru. Přefiltrovaná suspenze ze vzorku je z nasazené zkumavky nasávána do přístroje jehlou. Vyvolané zrychlení v trysce nutí částice cestovat jednu po druhé v centrálním proudu tekutiny. Tento proces se nazývá hydrodynamické zaostřování. Částice jsou poté změřeny pomocí intenzivního světelného paprsku v rozmezí 100-1000 částic/sec.

Průtokový cytometr se skládá z několika základních částí: ze zdroje světla, průtočné komory, optické sestavy, fotodetektoru a procesoru pro konverzi světelných signálů, analogově-digitální převodníky a počítačový systém pro analýzu a ukládání digitalizovaných dat. Částice v proudu toku odrážejí procházející světlo. Pokud částice byly obarveny fluorescenčním barvivem, jsou schopny světlo absorbovat a dochází k fluorescenční emisi. Některé částice mohou obsahovat přírodní fluorochromy (například chlorofyl), které po vybuzení také fluoreskují.

Detektory (většinou fotonásobiče) převedou světelné signály do elektrických proudových impulsů, které jsou pak amplifikovány pomocí lineárního nebo logaritmického zesilovače. Po amplifikaci je elektronický signál digitalizován pro další zpracování a uložen v počítači. Výsledky analýzy jsou obvykle zobrazeny ve formě histogramu, na kterém je znázorněna intenzita fluorescence a počet zkoumaných částic ve vzorku (Anonym 2, 2017). Detekce polyploidie u rostlin s využitím průtokové cytometrie se považuje za spolehlivou metodu.



Obrázek 1: Schéma průtokového cytometru (<http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/45>)

4. Metodika

4.1 Příprava materiálu

Pro účely této práce byl rostlinný materiál připraven dvěma způsoby, jednak byl pro pokus proveden odběr listů z rostlin rostoucích ve skleníku ČZU a pak teprve následoval převod pokusných explantátů do podmínek *in vitro*. Druhý přístup naopak spočíval v založení a namnožení plamenkových kultur v podmínkách *in vitro* a teprve poté následovaly pokusy s infiltrací oryzalinu pro získání tetraploidních rostlin. Pro kontrolní měření na porovnání úrovně ploidie byly převedeny do podmínek *in vitro* také diploidní odrůda Fuji a tetraploidní odrůda Fujix pěstované pro pokusy ve skleníku ČZU.

Navození indukce polyploidie plaménku latnatého na listech odebraných ze skleníku ČZU

Odebrané listy z rostlin pěstovaných v kontejnerech ve skleníku ČZU byly sterilizovány v 20 % roztoku Savo (4,7 % chlornan sodný) po dobu 15 minut, následně byly listy třikrát promyty sterilizovanou destilovanou vodou v patnácti minutových intervalech, aby se odstranily veškeré zbytky Sava. Po tomto kroku byly listy nařezány na jednotlivé segmenty o ploše zhruba 1cm^2 a umístěny do připravených Petriho misek s médiem MS (Murashige et Skoog, 1962) obohaceným o růstové hormony auxinu kyseliny indolyl – 3 – octové (IAA) v koncentraci $2,5\text{ mg. l}^{-1}$ a cytokininu thidiazuronu (TDZ) v koncentraci $1,5\text{ mg. l}^{-1}$. Pro navození tetraploidie byla v médiu použita koncentrace oryzalinu ($40\text{ }\mu\text{mol. l}^{-1}$) a dvě varianty doby jeho působení (7dní a 14 dní). Po tomto ošetření byly explantáty za účelem regenerace přemístěny do Petriho misek na základní MS médium pouze s přídavkem TDZ v koncentraci $0,5\text{ mg. l}^{-1}$. Po jednom měsíci až 6 týdnech pouze na regenerujících listových segmentech vznikaly kalusy. Po tuto dobu byly testované explantáty umístěny v inkubátoru s řízenou teplotou, která byla za světla $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ a za tmy $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fotoperioda osvětlení v inkubátoru byla po celou dobu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Vytvořené kalusy byly přemístěny do Erlenmeyerových baněk na nové MS médium s TDZ o koncentraci $0,5\text{ mg. l}^{-1}$ a jejich kultivace pokračovala v klimatizované místnosti s řízenou teplotou $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 16hodinovou světelnou fotoperiodou. Ze vzniklých výhonů byly dopěstovány rostlinky, které byly zkoumány, zda došlo k navození tetraploidie.

Pokus 1

Byly zkoumány 2 odrůdy plamenku latnatého: Marge a Dragon. Pokus byl od každé odrůdy založen v počtu 40 ks explantátů pro každou časovou variantu a dále ještě byly založeny kontrolní varianty po 15 kusech explantátů od každé odrůdy, které byly stejným způsobem kultivované, ale nebyly vystavené vlivu chemomutagenu oryzalinu.

Navození polyploidie na *in vitro* kulturách plaménku latnatého, napěstování *in vitro* kultur

Pro založení *in vitro* kultur byly odebrány listy z rostlin pěstovaných ve sklenicích ČZU. Listy se nejdříve sterilizovaly v 20 % roztoku Savo (4,7 % chlornan sodný) po dobu 15 minut, následně byly třikrát promyty sterilizovanou destilovanou vodou v patnácti minutových intervalech, aby se odstranily veškeré zbytky Sava. Následně se listy rozřezaly skalpelem na listové segmenty o ploše zhruba 1 cm². Takto připravené segmenty se vkládaly do sterilních Petriho misek na MS (Murashige et Skoog 1962) médium obohacené o růstové hormony auxinu kyseliny indolyl – 3 – octové (IAA) v koncentraci 2,5 mg. l⁻¹ a cytokininu thidiazuronu (TDZ) v koncentraci 1,5 mg. l⁻¹. Do jedné Petriho misky bylo umístěno 4 až 5 takto připravených listových explantátů. Petriho misky se umístily do inkubátoru, kde byla řízená teplota, která byla za světla 23 °C a za tmy 18 °C. Fotoperioda osvětlení v inkubátoru byla po celou dobu 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Za čtyři až šest týdnů se z listových explantátů vytvořily kalusy, na kterých vyrůstaly nové výhony. V případě, že z kalusů nedocházelo k regeneraci výhonů, bylo pro tyto kalusy MS médium doplněno o TDZ v koncentraci 0,5 mg. l⁻¹. Vytvořené výhony byly odříznuty a nasazeny na nové MS médium (Murashige et Skoog 1962) již bez fytohormonů. Z výhonů narostly za 1 až 3 měsíce rostliny, které byly následně využity k pokusu.

Při zakládání pokusu pro navození polyploidie infiltrací oryzalinu se jako výchozí rostlinný materiál použily celé listy, protože v podmínkách *in vitro* jsou daleko menší. Pouze se nařízla středová žilka na dvou místech pro lepší příjem látek z média do rostlinných pletiv. I zde se založila 7denní a 14denní varianta doby působení oryzalinu a byly použity dvě různé koncentrace oryzalinu (20 μmol. l⁻¹ a 40 μmol. l⁻¹). Připravené explantáty v Petriho miskách se opět umístily do inkubátoru a zhruba za čtyři až šest týdnů z nařezaných lístků vznikaly kalusy. Vitální kalusy byly přemístěny do Erlenmeyerových baněk na MS médium obohaceným o TDZ v koncentraci 0,5 mg. l⁻¹, aby se navodila tvorba výhonů. Explantáty byly přemístěny do klimatizované místnosti s řízenou teplotou 25 °C a 16hodinovou světelnou fotoperiodou. Vyrostlé výhony byly přemístěny na nové MS médium bez fytohormonů a byly z nich dopěstovány rostlinky, na kterých se zkoumalo, zda došlo k navození polyploidie.

Součástí pokusu byly i kontrolní rostliny, které nebyly vystaveny působení oryzalinu.

Pokus č. 2

Pro navození polyploidie z *in vitro* kultur byly zvoleny tři odrůdy. Windsor, Miss Peper a Lichtcom. Pokusy byly provedeny s koncentrací oryzalinu $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$. Od každé odrůdy bylo pro 7denní i 14denní variantu připraveno po 50 ks listových segmentů a dále ještě byly založeny kontrolní varianty po 10 kusech explantátů od každé odrůdy ke každé časové variantě.

Pokus č. 3

Z důvodu nižší regenerační schopnosti listových segmentů při použití koncentrace oryzalinu $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ se přistoupilo k pokusu stejným postupem, ale s poloviční koncentrací oryzalinu a to $20 \mu\text{mol. l}^{-1}$. Pro testování bylo použito po 30 ks listových segmentů od každé odrůdy a pro každou časovou variantu.

Příprava MS média

Medium bylo připraveno z přímé navážky a ze zásobních roztoků.

Na jeden litr MS média (Murashige et Skoog 1962) bylo přímo naváženo: $0,1\text{g. l}^{-1}$ myo inositolu, 30g. l^{-1} sacharózy a 8g. l^{-1} agaru. Dbáme na přesnost vážení surovin z přímé navážky a k vážení používáme laboratorní váhy. Ostatní složky MS média byly přidány z předem připravených zásobních roztoků A, B, C, D, E a V, jejichž složení obsahuje tabulka č. 1. Na jeden litr MS média ze zásobního roztoku A bylo přidáno 100 ml a po 10 ml od každého ze zásobních roztoků B, C, D, E a V. Zásobní roztoky byly pečlivě odměřeny pomocí odměrných válců. Do média pro navození polyploidie byly přidány fytohormony: auxin kyselina indolyl – 3 – octová (IAA) v koncentraci $2,5 \text{mg. l}^{-1}$ a cytokinin thidiazuron (TDZ) v koncentraci $1,5 \text{mg. l}^{-1}$. Do média pro následnou regeneraci byl přidán thidiazuron TDZ v koncentraci $0,5 \text{mg. l}^{-1}$. Obsah média byl doplněn destilovanou vodou na objem jednoho litru a bylo změřeno pH, které bylo upraveno v rozmezí mezi 5,7 až 5,8. Roztok se umístil do mikrovlnné trouby cca na 10 minut pro rozpuštění agaru i ostatních složek v médiu. Poté bylo médium vloženo do autoklávu a sterilizováno po dobu 30 minut při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku $103,4 \cdot 10^{-3} \text{MPa}$. Nechalo se chvíli vychladnout a pak bylo rozléváno ještě v tekuté formě do připravených sterilních Petriho misek ve flow boxu. V případě, že se do média přidával oryzalin, bylo nutné použít vysterilizovanou pipetu. Oryzalin nemůžeme přidávat před samotnou sterilizací, abychom neomezili jeho účinky vysokou teplotou při sterilizaci.

Přidávání oryzalinu probíhalo za sterilních podmínek ve flow boxu a dbalo se na to, aby se do rozlévaného média nezašle kontaminace. Po ukončení rozlévání média do Petriho misek se médium nechalo ztuhnout ve flow boxu a poté byly Petriho misky seskládány do komínku a obtočeny celofánovou folií jako ochrana před vniknutím kontaminací a takto připravené Petriho misky byly uloženy do chladicího boxu.

Při nalití rozpuštěného média do sterilních Erlenmeyerových baněk (alternativou k Erlenmeyerovým bankám mohou být obyčejné skleničky od dětských přesnídávek), zakryjeme plnicí otvor pomocí čtverečku z alobalu a sterilizujeme médium v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 ° C a tlaku 103,4 · 10⁻³ MPa. Jedná se o ekvivalent suchého horkého vzduchu o teplotě 160 ° C (Šebánek a Sladký, 1988). Pokud nebudou Erlenmeyerovy banky s médiem ihned použity, je vhodné je uchovávat ve chladícím boxu.

Zásobní roztok A:	Navážka na 1 l roztoku:
NH ₄ NO ₃	16,5 g
KNO ₃	19,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (bezvodý)	4,4 g (2,01 g)
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,7 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
Zásobní roztok B:	Navážka na 1 l roztoku:
H ₃ BO ₃	0,62 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O (H ₂ O)	2,23 g (1,69 g)
ZnSO ₄ · 4H ₂ O (7 H ₂ O)	0,86 g (1,06 g)
Zásobní roztok C:	Navážka na 1 l roztoku:
KJ	0,083 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,025 g
Zásobní roztok D:	Navážka na 1 l roztoku:
CuSO ₄ · 2H ₂ O	0,0025 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0025 g
Zásobní roztok E:	Navážka na 1 l roztoku:
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	3,73 g (1,86 g)

FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78 g (1,39 g)
Zásobní roztok V:	Navážka na 1 l roztoku:
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:	100ml A
	10 ml B
	10 ml C
	10 ml D
	10 ml E
	10 ml V
pH upravit na 5,7 až 5,8	

Tabulka 1: Základní komponenty MS média

4.2 Testování ploidie

Testování ploidie může probíhat několika způsoby. Základem je porovnávání znaků u odrůd, u kterých již došlo k získání tetraploidních rostlin. Jako například u odrůdy Fuji, která je diploidní a z ní odvozené tetraploidní odrůdy Fujix byly pozorovány viditelné odlišovací znaky (Matiska, 2016). Jedná se například o rozdílný habitus, rozdílný tvar listů, kdy jsou listy u tetraploida oválnější, větší a jejich tmavší barva je způsobená větším množstvím chlorofylů a karotenoidů, postavení listů na stonku může být u tetraploidů střídavé. Tyto vizuální rozdíly však nezaručují přesné určení, zda se jedná o tetraploidní rostlinu. Pro přesnější určení potřebujeme spolehlivější určení jako např. měření obsahu chlorofylů.

V této práci bylo prováděno měření obsahu celkového chlorofylu pomocí chlorofylmetru CCM-200. Pro měření obsahu chlorofylů se používají listy. Příprava listů probíhala ve flow boxu ve sterilních podmínkách, kde bylo z dané rostlinky odebráno několik

listů a rostlinka přesazena do nové Erlenmeyerovy baňky s čerstvým MS médiem za účelem dalšího zkoumání a testování. Odebrané listy byly vloženy do sklenice s vodou a obsah chlorofylů byl změřen po přiložení listu na měřicí část přístroje chlorofylmetru CCM-200 na základě rozdílů absorpcí listu při 670 a 750 nm. Obsah celkového chlorofylu byl zjišťován u 9 rostlin u odrůdy Marge a 20 rostlin odrůdy Miss pepper. Naměřené výsledky byly porovnávány s naměřenými hodnotami u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix.

Dalším způsobem pro měření chlorofylů byla využita metoda Porra, 2001. K tomuto účelu byly použity stejné listy, jako při měření chlorofylmetrem. Z listu byl pomocí korkovrtu vyseknut terčík o ploše o 0,5 cm². Součástí výseku nesměly být cévy. Poté se terčík vložil do zkumavky s 1 ml dimethylformidu (DMF), přikryl se parafilmem a černou látkou a nechal se třepat na třepačce přes noc v digestoři. Druhý den se extrakt přelil do spektrofotometrických kyvet a byla změřena absorbance při 480; 646,8; 663,8 a 710 nm. Výsledky měření byly porovnávány s naměřenými hodnotami odrůd diploidní Fuji a tetraploidní Fujix. Data získaná při měření pomocí chlorofylmetru CCM- 200, kde se měří rozdíl absorpcí listu při 670 a 750 nm a data získaná z výluhu listů, kde se měří absorbance listů z jejich výluhu při vlnových délkách 480; 646,8; 663,8 a 710 nm byla dále podrobena statistické analýze v programu Statistica 12. Pro porovnání obsahu chlorofylů mezi odrůdami byla zvolena jednofaktorová analýza rozptylu (Anova), pro porovnání byl zvolen Duncanův test. Jako závislá proměnná byly zvoleny hodnoty chlorofylů a karotenoidů a jako nezávislá proměnná byly zvoleny konkrétní odrůdy.

Pokud u některých ze zkoumaných lístku rostlin, které prošly působením oryzalinu, byly zjištěny naměřené skokové rozdíly u jedné nebo obou zmíněných metod, byly tyto rostliny vybrány pro další zkoumání pomocí průtokového cytometru. Měření pomocí průtokového cytometru je nejspolehlivější metodou pro určení ploidie. Pro měření na průtokovém cytometru byly nejdříve z každé rostliny odebrány 1 až 2 listy. Listy se nakrájely žiletkou na malé kousky, přelily se roztokem kyseliny citronové a rozmělnily žiletkou na malé částičky. Tato směs se přefiltrovala, aby nedošlo k zanesení průtokové části cytometru. Ke kapce filtrátu se přidal 1ml fluorescenční látky (DAPI), která je schopná se vázat na DNA a takto připravený roztok se vložil do průtokového cytometru. Průtokový cytometr se musel nakalibrovat podle kontrolních vzorků. K tomuto účelu byla použity standardní odrůdy, diploidní Fuji a tetraploidní Fujix. Naměřené výsledky analýzy k posouzení úrovně ploidie byly zobrazeny ve formě histogramů.

Ploidie pomocí průtokového cytometru byla ověřována u 102 rostlin, z toho 48 rostlin bylo od odrůdy Miss pepper a 54 rostlin bylo od odrůdy Marge. Z úsporných důvodů byly

pouze z rostlin s naměřenými vyššími hodnotami chlorofylů analyzovány jednotlivé vzorky. Z rostlin s nižší hodnotou chlorofylů byly vytvořeny 4 skupiny směsných vzorků (A, B, C, D). Do směsných vzorků byly začleněny i pokusné rostliny, které dorostly později a nebyl u nich obsah chlorofylů testován. Vzhledem k tomu, že se ve dvou skupinách směsných vzorků (A a B) detekovaly tetraploidní rostliny, bylo nutné jednotlivé vzorky doměřit a určit konkrétní zastoupení tetraploidních rostlin.



Obrázek 2: Tetraploidní odrůda Fujix



Obrázek 3: Diploidní odrůda Fuji

5. Výsledky

Indukce polyploidie z listových segmentů odebíraných z nesterilních rostlin (skleníky ČZU)

Pokus číslo 1

U odrůdy Dragon nedošlo u žádné z variant působení oryzalinu k regeneraci explantátů a netvořily se kalusy (tab. 2). U odrůdy Marge došlo k regeneraci a vytvoření kalusu pouze u jednoho segmentu 14. denní varianty listového explantátu, tento kalus byl však příliš slabý a nakonec odumřel. U 7. denní varianty u této odrůdy došlo k regeneraci 3 listových segmentů, ze kterých se vytvářely kalusy. Jeden z těchto kalusů velmi brzy odumřel, druhý i když regeneroval velmi pomalu, tak se z něho podařilo získat výhony, které byly testovány na tetraploidii. Z třetího nejsilnějšího kalusu byl získán nejvyšší počet výhonů pro testování na polyploidii. (tab. 2). Celkově u odrůdy Marge zregenerovalo 5 % založených listových segmentů. U kontrolních variant docházelo přibližně k 50% regeneraci listových explantátů a tvorbě kalusů. Po jednom měsíci až 6 týdnech se podařilo získat výhony pro kontrolní testování na ploidii.

INTERVAL PŮSOBENÍ	ODRŮDA	POČET ZALOŽENÝCH SEGMENTŮ	POČET ZREG. SEGMENTŮ	POČET ZREGENEROVANÝCH SEGMENTŮ (%)
7 denní	Marge	40	3	(7,5 %)
14 denní	Marge	40	1	(2,5 %)
7 denní	Dragon	40	0	0(0%)
14 denní	Dragon	40	0	(0%)
Kontrolní varianta	Marge	15	8	(53%)
Kontrolní varianta	Dragon	15	7	(46,67 %)

Tabulka 2: Počty zregenerovaných segmentů u odrůd Marge a Dragon



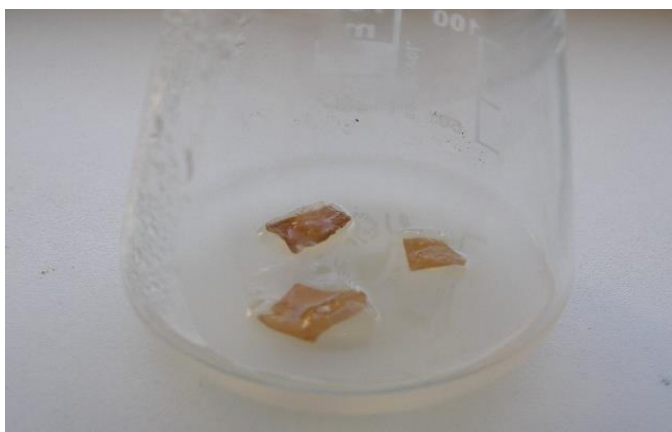
Obrázek 4: 7denní varianta s aplikací oryzalinu u odrůdy Marge krátce po založení



Obrázek 5: 7denní varianta s aplikací oryzalinu u odrůdy Dragon krátce po založení



Obrázek 6: Ukázka regenerace kalusu u 7denní varianty pokusu odrůdy Marge po 6 týdnech kultivace



Obrázek 7: Nezdařená regenerace u 7denní varianty pokusu odrůdy Dragon

Indukce polyploidie z listových segmentů odebíraných z napěstovaných sterilních rostlin kultivovaných v podmínkách *in vitro*

Pokus číslo 2:

U každé ze zkoumaných odrůd (Windsor, Miss Peper a Lichtcom) po provedení pokusu s oryzalinem v koncentraci $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ započala regenerace a tvorba kalusů. Ze 300 založených listových segmentů jich zregenerovalo 5,66 %. U zbývajících kalusů se objevily nekrotické změny a ve většině případů došlo k jejich úhynu. Počty

zregenerovaných listových segmentů jsou uvedeny v tabulce č. 3. Nejlepší schopnost regenerace byla pozorována u odrůdy Windsor. u odrůdy Miss pepper byly zaznamenány o něco horší výsledky a nejhůře regenerovala odrůda Lichtcom.

Tabulka 3: Počty zregenerovaných listových segmentů u druhého pokusu

Interval působení	Odrůda	Počet testovaných listových segmentů	Počet zregenerovaných listových segmentů	Počet zregenerovaných listových segmentů v %
7denní	Miss pepper	50	4	8 %
14denní	Miss pepper	50	2	4 %
k. 7denní	Miss pepper	10	7	70 %
k. 14denní	Miss pepper	10	8	80 %
7denní	Windsor	50	4	8 %
14denní	Windsor	50	6	12 %
k. 7denní	Windsor	10	8	80 %
k. 14denní	Windsor	10	8	80 %
7denní	Lichtcom	50	1	2 %
14denní	Lichtcom	50	0	0 %
k. 7denní	Lichtcom.	10	9	90 %
k. 14denní	Lichtcom	10	7	70 %



Obrázek 8: Explantáty *Phlox paniculata* připravené pro aplikaci s oryzalinem

Pokus číslo 3:

S ohledem na nižší počty zregenerovaných explantátů při použití oryzalinu v koncentraci $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ byl založen nový pokus s poloviční koncentrací oryzalinu, tedy $20 \mu\text{mol. l}^{-1}$. Ze 180 založených listových segmentů jich zregenerovalo 10,55 %. Počty zregenerovaných listových segmentů jsou uvedeny v tabulce č. 4. Z výsledků vyplývá, že nejlépe zregenerovala odrůda Windsor, která při založení 30 explantátů od každé časové varianty zregenerovala v 7 případech u 7denní varianty a v 6 případech u 14denní varianty. Odrůda Miss pepper u 30 založených explantátů od každé varianty zregenerovala u 7denní varianty ve 3 případech a u 14denní varianty pouze ve 2 případech. Nejhůře zregenerovala odrůda Lichtcom, kdy z 30 založených segmentů od každé varianty zregeneroval pouze jeden u 7denní varianty aplikace oryzalinu.

Interval působení	odrůda	Počet založených segmentů	Počet zregenerovaných segmentů	Počet zregenerovaných segmentů %
7denní	Miss pepper	30	3	10 %
14denní	Miss pepper	30	2	6,6 %
7denní	Windsor	30	7	21 %
14denní	Windsor	30	6	18 %
7denní	Lichtcom	30	1	3,3 %
14denní	Lichtcom	30	0	0 %

Tabulka 4: Počty zregenerovaných listových segmentů u třetího pokusu

Měření obsahu chlorofylů pomocí chlorofylmetru CCM-200

Orientační zjišťování polyploidie dle obsahů chlorofylů bylo u testovaných rostlin měřeno pomocí přístroje chlorofylmetru CCM-200. U diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix, které byly plánovány jako standardy k porovnávání s testovanými rostlinami se provedly celkově dvě měření obsahu chlorofylů (tab. 5 a 6). Každý list, u kterého byl měřen obsah chlorofylů byl v přístroji posouván tak, aby byl získán výsledek z celého listu (cca 10krát, pokud to umožňovala jeho listová plocha). Ze získaných hodnot byl vypočten průměr. U tetraploidní odrůdy Fujix byly naměřeny vyšší hodnoty chlorofylů. Tento výsledek by potvrdil domněnku vyššího obsahu chlorofylů u tetraploidní odrůdy. Při vyjádření v procentech vykazovala odrůda Fujix v průměru o 91 % (s odchylkou ± 20 %) vyšší obsah chlorofylů než odrůda Fuji. Dále bylo provedeno měření chlorofylů u testovaných odrůd Marge (9 rostlin) a Miss pepper (20 rostlin), hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 7, 8 a 9. U odrůdy Marge se průměrné hodnoty pohybovaly v rozmezí 1,325 až 4,33 a u kontrolní diploidní varianty této odrůdy byla naměřena hodnota 1,79. Pokud bychom u odrůdy Marge uvažovali pro detekci tetraploidů s podobným poměrem chlorofylů jako u standardních odrůd Fuji a Fujix, byla by teoretická hodnota chlorofylů pro tetraploidní rostlinu této odrůdy 3,4 s odchylkou $\pm 0,38$. U odrůdy Miss pepper byla naměřena u kontrolní diploidní rostliny hodnota 2,59. U rostlin ovlivněných oryzalinem se průměrné hodnoty chlorofylů pohybovaly v rozmezí 0,68 až 11,72. Pokud bychom u odrůdy Miss pepper počítali s podobným poměrem chlorofylů jako u standardních odrůd, hodnota tetraploidní rostliny by byla $\pm 4,95$ s odchylkou $\pm 0,54$.

U odrůdy Marge byly u rostlin označených č. 1, 4, 6, 7, 8 a 9 zjištěny větší hodnoty chlorofylů oproti kontrolnímu vzorku. Odchylku pro tetraploidní rostlinu však splňoval pouze vzorek č. 1. U odrůdy Miss pepper splňovaly odchylku pro možnou tetraploidii rostliny č. 1, 15 a 16. Kontrolní diploidní rostliny odrůdy Marge (1,79) a Miss Pepper (2,59) měly vyšší hodnoty chlorofylů, než byly zjištěny u rostlin tetraploidní odrůdy Fujix (1,46).

Podle výstupu z Duncanova testu z programu Statistica 12 (viz. příloha, Tab. A) nebyly zjištěny z 95% pravděpodobností statisticky průkazné rozdíly mezi odrůdami Fuji a Fujix na základě naměřených hodnot chlorofylů. Z tohoto výsledku lze usoudit, že tímto postupem detekovat případné tetraploidní rostliny je problematické. Statistickému hodnocení byly podrobeny hodnoty chlorofylů vzorků testovaných odrůd i v porovnání se standardními odrůdami. Statisticky průkazné rozdíly byly zaznamenány u rostliny číslo 1 u odrůdy Marge a u rostlin číslo 1, 15 a 16 u odrůdy Miss pepper (viz. příloha, Tab. A). Výsledek statistického

vyhodnocení je také znázorněn graficky. Na grafu č. 1 jsou znázorněny hodnoty chlorofylů testovaných vzorků.

Fuji	Fujix
0,7	1
0,8	1,4
1	1,3
0,7	1,7
0,4	2
0,5	1,4
1	1,5
0,8	1,7
0,7	1,4
0,5	1,9
Suma: 7,1	Suma: 14,6
Průměr: 0,71	Průměr: 1,46

Tabulka 5: 1. měření hodnot chlorofylů u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Fuji	Fujix
1,6	2,4
1,1	1,9
1,2	1,6
0,6	1,5
0,5	1,8
1,5	1,5
1,2	2,9
1,6	2
0,9	2,8
1,3	1,8

Suma: 11,5	Suma: 20,2
Průměr: 1,15	Průměr: 2,02

Tabulka 6: 2. měření hodnot chlorofylů u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Odrůda:	Marge Kontrolní	Marge 1	Marge 2	Marge 3	Marge 4	Marge 5	Marge 6	Marge 7	Marge 8	Marge 9
	2,3	5,2	1	1,6	1,5	0,8	1,4	2	2,5	2,5
	2,1	3,2	0,9	1,2	2,2	0,9	1,7	5	2,1	2,1
	2,1	6,2	1,2	1,8	2,2	0,9	1,6	2,1	2,2	1,4
	2	3,3	2,2	1,1	2	1,2	3,4	2	2,5	3,1
	1,1	4,3		1,9	1,9	1,4	2,8	2,3		4,5
	2,1	4,6		2,1	2,1	0,9	1,3	2,2		2,7
	0,8	3,5			2,3	1,2		5,1		2,2
					1,9	1,7				
Suma	12,5	30,3	5,3	9,7	16,1	9	12,2	20,7	9,3	18,5
Průměr	1,79	4,33	1,325	1,62	2,01	1,125	2,03	2,96	2,325	2,64

Tabulka 7: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Marge

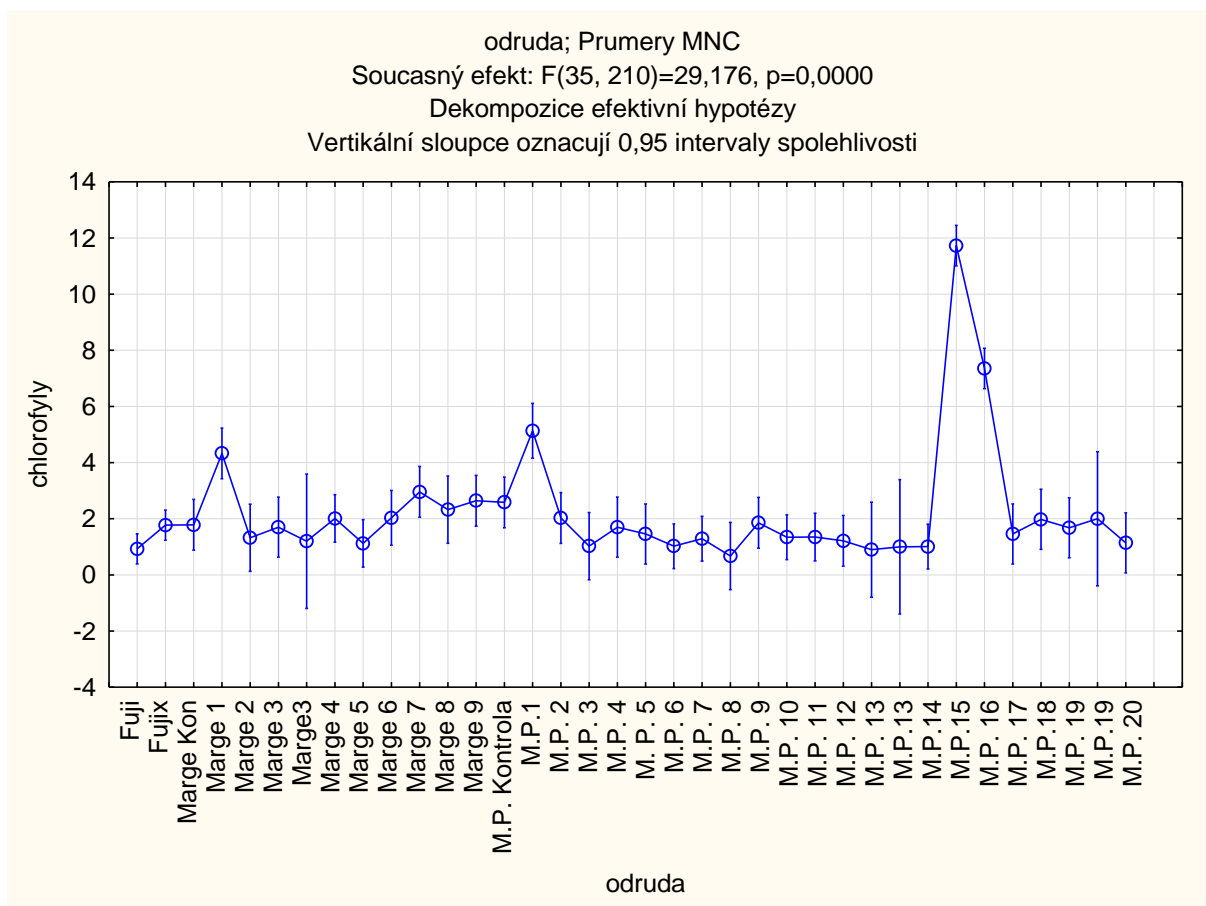
Odrůda:	M.p. k	M.p. 1	M.p. 2	M.p. 3	M.p. 4	M.p. 5	M.p. 6	M.p. 7	M.p. 8	M.p. 9	M.p. 10
	3,1	3,8	1	1	1,7	0,9	1,1	1	0,9	1,9	1,1
	2,1	8,4	0,8	0,9	1,8	1,4	0,9	0,9	0,7	1,8	1,2
	1,9	3,1	1,8	1,1	1,5	1,5	0,9	1,6	0,9	2,9	1,4
	6,9	7,5	2,5	1,1	1,7	1,7	1,1	1,7	0,2	1,9	1,3
	1,3	6,5	2		1,8	1,8	1,2	1		1,8	1,4
	1,9	1,5	3,2				1,1	1,9		1,2	1
	0,9		2,9				0,9	1,1		1,5	1,7

							0,9	0,9			1,5
							1,1	1,5			1,5
Suma	20,72	30,8	14,2	12,2	8,5	7,3	9,2	11,6	2,7	13	12,1
průměr	2,59	5,13	2,03	3,05	1,7	1,46	1,02	1,29	0,68	1,86	1,34

Tabulka 8: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Miss pepper (první část)

Odrůda:	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.	M.p.
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	1,3	1,3	0,9	0,9	10,1	2,9	1,4	1,9	1,9	0,8
	2	1,3	0,9	1	18,9	3,3	1,3	1,1	2	0,9
	1,3	1,4	1	1,1	10,1	3,5	1,5	1,9	1,9	1,1
	1,1	1,2		0,7	12,1	3,1	1,6	2	1,8	1,4
	0,9	1,6		1,3	13,3	9,9	1,5	3	1,3	1,5
	1,4	0,8		0,9	12	9,6			1,5	
	1,7	0,9		0,9	12,4	10				
	1,1			1,3	11,9	10				
				1	11,5	9,9				
					8	8,8				
					8,7	9,9				
Suma:	10,5	8,5	2,8	8,1	129	80,9	7,3	9,9	10,4	5,7
Průměr:	1,31	1,21	0,93	0,9	11,72	7,35	1,46	1,98	1,73	1,14

Tabulka 9: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Miss pepper (druhá část)



Graf 1: Výstup z programu Statistica 12, grafické znázornění hodnot chlorofylů u testovaných rostlin

Měření podle metody Porra

Obsahy chlorofylů, a navíc i karotenoidů byly zjišťovány s využitím metody Porra. Byly měřeny obsahy chlorofylu a, chlorofylu b a obsah karotenoidů. Měření bylo nejprve uskutečněno u srovnávacích odrůd, diploidní Fuji a tetraploidní Fujix (od každé po třech rostlinách). U tetraploidní odrůdy Fujix byl naměřen vyšší obsah chlorofylů i karotenoidů (tab. 10). U odrůdy Miss pepper bylo testováno 20 vzorků rostlin, které byly ovlivněny chemomutagenem oryzalinem a pro porovnání jedna kontrolní rostlina. U odrůdy Marge bylo

testováno 9 rostlin a také jedna jako kontrola. Téměř u všech testovaných vzorků včetně kontrol se obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů pohybovaly ve vyšších hodnotách oproti rostlinám standardních odrůd (tab. 10, 11, 12). Celkový poměr chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů mezi jednotlivými odrůdami je znázorněn v grafu 2. Byly porovnávány průměrné hodnoty všech zkoumaných odrůd. U odrůdy Fuji byl celkový chlorofyl 0,52, u Fujix 0,94, u Marge 3,78, u Miss Pepper 4,48. Karotenoidy byly zjištěny u odrůdy Fuji 0,1, u Fujix 0,51, u Marge 0,93 a u Miss pepper 0,83. U odrůdy Marge byla naměřena vysoká hodnota celkového chlorofylu u kontrolní varianty (5,56). Na základě zjištěných vyšších obsahů chlorofylů a karotenoidů byly vybrány rostliny pro jednotlivá měření průtokovou cytometrií pro ověření, zda byl správný předpoklad, že se jedná o tetraploidní rostliny. Od odrůdy Marge byly vybrány rostliny č. 1, 7 a 9 a od odrůdy Miss pepper rostliny číslo 1, 2, 3, 15,16 a 18.

Podle Duncanova testu v programu Statistica 12 se na základě naměřených hodnot chlorofylu a nepotvrdily statisticky průkazné rozdíly mezi odrůdami Fuji a Fujix. Statisticky průkazné rozdíly však byly zaznamenány na základě hodnot chlorofylu b a karotenoidů. Rozdíly na základě naměřených hodnot obou chlorofylů i karotenoidů u testovaných vzorků odrůd Marge a Miss pepper nebyly statisticky průkazné a na základě těchto výsledků nebylo možné určit u kterých rostlin došlo ke zvýšení ploidie. Výsledky statistického hodnocení Duncanova testu jsou znázorněny v tab. B, C, D, viz příloha.

Odrůda	Chlorofyl a	Chlorofyl b	Celkový chlorofyl	Karotenoidy
Fuji 2n	0,56224	0,0836	0,64584	0,1245
Fuji 2n	0,45468	0,04928	0,50396	0,1012
Fuji 2n	0,3449	0,04676	0,41166	0,08162
Suma:	1,3618	0,1796	1,5614	0,30696
Průměry:	0,45439	0,05986	0,5204	0,10232
Fujix 4n	0,60047	0,20466	0,80513	0,6285
Fujix 4n	0,49825	0,28526	0,78351	0,5083
Fujix 4n	0,94715	0,29786	1,24501	0,4079
Suma:	2,0458	0,78778	2,8336	1,5447
Průměry:	0,6819	0,2625	0,9445	0,5149

Tabulka 10: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů získaných metodou Porra u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Odrůda	Chlorofyl a	Chlorofyl b	Celkový chlorofyl	Karotenoidy
Marge kontrola	4,005	1,5522	5,5573	1,09236
Marge 1	3,6054	0,75852	4,3639	0,9637
Marge 2	1,6938	0,6580	2,3518	0,5960
Marge 3	3,4739	0,73396	4,2078	0,9840
Marge 4	2,5769	0,55228	2,8768	0,60053
Marge 5	1,24938	0,31156	1,5609	0,4244
Marge 6	2,17476	0,75488	2,9294	0,6769
Marge 7	4,6144	1,24592	5,8603	1,2546
Marge 8	6,44826	1,9442	8,3925	1,5572
Marge 9	1,11427	0,38602	1,5002	0,2636
Suma:	26,9510	7,3453	34,0436	8,4133
Průměr:	2,994	0,8161	3,7826	0,9348

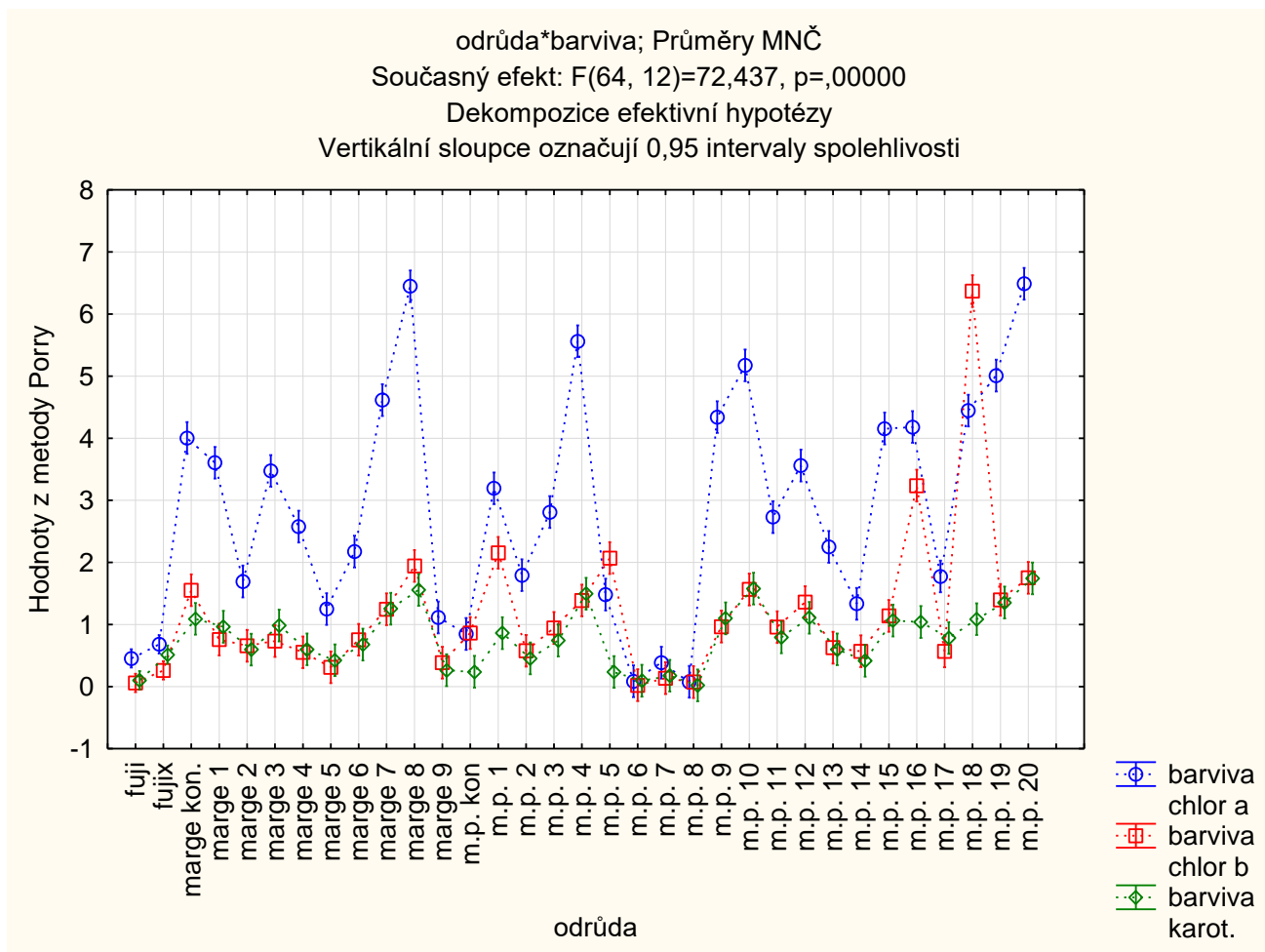
Tabulka 11: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů u rostlin odrůdy Marge

Odrůda	Chlorofyl a	Chlorofyl b	Celkový chlorofyl	Karotenoidy
Miss pepper kontrola	0,8485	0,8634	1,6548	0,2390
Miss pepper 1*	3,19353	2,1555	5,3490	0,8611
Miss pepper 2*	1,7956	0,5773	2,3729	0,4543
Miss pepper 3*	2,8113	0,9449	3,7561	0,7414
Miss pepper 4	5,5624	1,3873	6,9497	1,4959
Miss pepper 5	1,4819	2,0709	3,5528	0,2358
Miss pepper 6	0,0866	0,0233	0,1099	0,0943
Miss pepper 7	0,3853	0,1360	0,5213	0,1752
Miss pepper 8	0,0777	0,074	0,0851	0,0190
Miss pepper 9	4,3406	0,9669	5,3075	1,0987

Miss pepper 10	5,173	1,5642	6,7395	1,5792
Miss pepper 11	2,7303	0,9582	3,6886	0,7930
Miss pepper 12	3,5601	1,3624	4,9225	1,1085
Miss pepper 13	2,2503	0,6265	3,8768	0,6005
Miss pepper 14	1,334	0,5695	1,9043	0,4167
Miss pepper 15	4,1570	1,1391	5,2962	1,0633
Miss peper 16	4,1811	3,2370	7,4181	1,0409
Miss pepper 17	1,7747	0,5662	2,3410	0,7825
Miss pepper 18	4,4449	6,3693	10,8142	1,0857
Miss pepper 19	5,0086	1,3978	6,4064	1,3541
Miss pepper 20	6,4882	1,7523	8,2406	1,7429
Suma:	60,8371	27,8786	89,6525	16,743
Průměry:	3,0418	1,3939	4,4826	0,8372

Tabulka 12: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů u rostlin odrůdy Miss pepper

* tetraploidní rostliny Miss pepper z výstupu průtokového cytometru



Graf 2: Výstup z programu Statistica 12, grafické znázornění porovnání obsahů chlorofylu (a, b) a karotenoidů u testovaných rostlin

Měření pomocí průtokového cytometru.

Pro měření na průtokovém cytometru bylo získáno celkově 102 rostlin, z toho 48 rostlin bylo od odrůdy Miss pepper a 54 rostlin bylo od odrůdy Marge (viz. tab. 13). Z tohoto množství bylo na základě zjištěných výsledků obsahu chlorofylů vybráno několik rostlin jako jednotlivé vzorky. Jednalo se o rostliny číslo: 1, 7 a 9 u odrůdy Marge a o rostliny číslo 1, 2, 3, 15, 16 a 18 u odrůdy Miss pepper. Z ostatních rostlin se vytvořily směsné vzorky pro jednotlivá měření. Z výstupů průtokového cytometru byly nejprve pro porovnání získány histogramy dvou standardních odrůd diploidní Fuji a tetraploidní Fujix (viz. příloha, graf A a B). Na základě těchto výstupů bylo určeno u testovaných rostlin, zda se jedná o diploidní nebo tetraploidní vzorky. U rostlin číslo 1, 2 a 3 odrůdy Miss pepper se prokázalo, že se jedná o tetraploidní jedince. U výsledků z měření směsných vzorků se ve dvou skupinách (A, B)

ukázalo, že mezi nimi byly zastoupeny i tetraploidní rostliny. Proto bylo provedeno měření vzorků z těchto skupin jednotlivě. Ve skupině A byla zjištěna jedna tetraploidní rostlina, ve skupině B to bylo šest tetraploidních rostlin. Celkově bylo detekováno 10 tetraploidních rostlin z 48 testovaných rostlin odrůdy Miss pepper. U vzorků odrůdy Marge žádný tetraploid detekován nebyl. Nejlepší pokusnou variantou pro získání tetraploidních rostlin se ukázala u odrůdy Miss pepper varianta s koncentrací oryzalinu $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ působící po dobu 7 dnů (viz tab. 14). Výstupy z průtokového cytometru jsou znázorněny na grafech A až H viz příloha.

Odrůda:	Počet vzorků	Počet Diploidních rostlin	Počet tetraploidních rostlin	Procento detekovaných tetraploidů
Marge	54	54	0	0 %
Miss pepper	48	38	10	20,83 %

Tabulka 13: Výsledky z měření průtokovým cytometrem

Interval působení (dny)	Koncentrace Or. $\mu\text{mol. l}^{-1}$	Procento zregenerovaných listových explantátů	Počet získaných výhonů	Počet získaných tetraploidních rostlin	Procento získaných tetraploidních rostlin
7	20	10 %	14	1	7,1 %
7	40	8 %	17	6	35,29 %
14	20	6,6 %	9	1	11,1 %
14	40	4 %	8	2	25 %

Tabulka 14: Koncentrace oryzalinu a časové varianty u získaných tetraploidů u odrůdy Miss pepper

6. Diskuze

Pro získání tetraploidních rostlin u okrasného druhu trvalek *Phlox paniculata* byla použita mikropropagační technologie. Tuto metodu použili i další autoři pro navození tetraploidie u jiných plodin za účelem získání kompaktních rostlin, větších květů, vyšších výnosů, zvýšené odolnosti vůči chorobám a škůdcům, lepší rozmnožovací schopnosti, aj. jako například Ozair M. et al. (2014) pro dosažení vyšších výnosů u olivovníku, Carvalho et al. (2016) pro vyšší produkci u manioku jedlého, Allum et al. (2007) pro lepší užitkovost u růže svraskalé, Greplová M. a kol. (2009) u šlechtění brambor na rezistenci k plísni bramborové.

U *phlox paniculata* jako u rostliny okrasné květem byla navozována tetraploidie za účelem získání nových odrůd, které jsou přizpůsobivější vůči prostředí, vykazují lepší rezistenci vůči patogenům a vyznačují se bohatšími a většími květy. Práce zabývající se zvyšováním ploidie u tohoto druhu jsou doposud ojedinělé. Matiska a Vejsadová (2009) zvyšovali ploidiu u *Phlox paniculata* s využitím chemomutagenů kolchycinu a oryzalinu u diploidního kultivaru *Phlox paniculata* 'Fuji'.

Ze sazenic *Phlox paniculata* kultivarů Miss pepper, Marge, Fuji, Fujix, Lichtcom, Windsor, Dragon, které se použily pro účely této práce, jsme buďto listové segmenty použili přímo pro aplikaci oryzalinu nebo je nejprve převedli do kultur *in vitro* a k pokusu s aplikací oryzalinu byly použity až následovně. Výhodou zakládání pokusů u plamenky latnaté z rostlin kultivovaných v podmínkách *in vitro* je, že můžeme pokusy provádět kdykoliv během roku a nejsme vázáni na vegetační dobu růstu plamenku. Další významnou výhodou je, že můžeme napěstovat velké množství vhodných rostlin pro odběr listů, které jsou již ve sterilních podmínkách a není třeba na ně působit sterilizačními prostředkem např. Savo, jako tomu bylo v případě zakládání pokusu z kontejnerovaných rostlin. Tím také eliminujeme současné působení Sava a oryzalinu na výchozí rostlinný materiál zvolený pro pokus. Díky tomuto máme vyšší pravděpodobnost na lepší úspěšnost při regeneraci kalusů a větší výtěžnost na počet založených explantátů. Nevýhodou tohoto způsobu je časová náročnost, kdy nejprve musíme převést listové segmenty do sterilního prostředí *in vitro* a dále navodit tvorbu kalusů, z kterých následně získáme výhony nových rostlin pro dopěstování.

Ke kultivaci explantátů bylo použito modifikované médium MS (Murashige and Skoog, 1962) s přidáním IAA v koncentraci 2,5 mg. l⁻¹ a thidiazuronu v koncentraci 1,5 mg. l⁻¹. Založení explantátových kultur z listových segmentů představuje úsporu výchozích rostlin a dosažení vyššího množitelského koeficientu oproti zakládání kultur z nodálních segmentů.

Listové segmenty regenerovaly v jednotlivé kalusy, ze kterých vyrůstal vyšší počet výhonů. Namnožení vyššího počtu explantátů je také přínosem pro další pokusy.

Explantátové výhony byly využity pro pokusy navození polyploidie s využitím chemomutagenu oryzalinu. Z předešlých pokusů práce Konopíkové (2016) vyplynulo, že koncentrace oryzalinu $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ je hraniční pro regeneraci u odrůdy Miss pepper. Zároveň vyšší koncentrace oryzalinu poskytuje větší pravděpodobnost získání požadované mutace (Matiska, Vejsadová, 2009). Proto byla v této práci tato hraniční koncentrace odzkoušena u testovaných odrůd. Regenerace u pokusů se zvýšenou koncentrací oryzalinu $40 \mu\text{mol. l}^{-1}$ se podařila pouze v rozmezí 2 až 12 % u odrůd Marge, Miss pepper a Windsor. Lepší regenerační schopnosti byly zaznamenány u kratší, tj. 7denní varianty působení oryzalinu, kdy se však pravděpodobně snižuje naděje na zvýšení polyploidie. U pokusu s koncentrací oryzalinu $20 \mu\text{mol. l}^{-1}$ se dosáhlo vyšší regenerace a to 21 % u odrůdy Windsor. Regenerace listových segmentů probíhala po aplikaci s oryzalinem na živném médiu stejného složení, ale se sníženou koncentrací TDZ ($0,5 \text{ mg. l}^{-1}$). Tato nižší koncentrace TDZ byla zvolena s ohledem na předcházející zkušenosti s kultivací v *in vitro* podmínkách při zakládání kultur. Pro regeneraci rostlinných segmentů v kalusy po působení oryzalinu se však ukázala jako nedostatečná. Z tohoto zjištění vyplývá doporučení u příštích pokusů otestovat zvýšenou dávku TDZ.

Tvorba kalusů a následný růst výhonů probíhá 4 až 6 týdnů, pokud po této době kalusy nevytvářejí výhony je nutné je pasážovat do média opět obohaceného o TDZ. Dle předešlých pokusů s phloxy se nejvíce osvědčila poměrně nízká koncentrace TDZ (thidiazuronu) $0,5 \text{ mg. l}^{-1}$. Dalším poznatkem při vytváření výhonů z kalusů po opakovaném převodu na médium s TDZ bylo, že vznikalo velkého množství vitrifikovaných výhonů. Takto vzniklé výhony bylo třeba někdy i několikrát přepasážovat na čisté MS médium (Murashige et Skoog 1962), abychom je zbavili vlivu TDZ, pro vznik standardních rostlin. Z tohoto důvodu je nutná optimalizace obsahu TDZ v médiu.

Při zakládání pokusu ze segmentů listů odebraných z rostlin rostoucích ve skleníku ČZU došlo ve většině případů k jejich úhynu. Potvrdil se podobný výsledek z předešlých zkoumání Konopíkové (2016) a lze vyvodit závěr, že tato metoda není příliš vhodná pro pokusy se zvyšováním polyploidie, a to i přes nespornou výhodu založit pokus bez nutnosti převádět rostliny nejprve do podmínek *in vitro*.

Jak již bylo zmíněno, aplikace oryzalinu na okrasné trvalce *Phlox paniculata* probíhala dosud ojedinele, pro zvýšení ploidie se prováděly pokusy s aplikací oryzalinu i na dalších druzích rostlin. Na *Impatiens balsamina* byla vyzkoušena aplikace na klíčící semena. Na

základě analýzy FCM se nepodařilo získat tetraploidní rostliny, přesto získané mixoploidní rostliny měly kompaktnější růst a plnější květy (Defiani et al. 2013). Obdobný pokus s aplikací na klíčící semena byl prováděn na *Hibiscus acetosella* Panama Red´ (Contreras and Ruter, 2009) a na *Acacia Crassicarpa*, kde byl navíc využit i kolchicin (Lam et al., 2014).

Pro pokusy s navozením polyploidie některých rostlin byla využita mikroprogační technologie jako v této práci. V podmínkách *in vitro* probíhaly pokusy například s *Rosa rugosa*, kdy s využitím nodálních segmentů se při koncentraci oryzalinu 2,5 $\mu\text{mol. l}^{-1}$ podařilo získat až 44 % tetraploidních listů (Allum et al., 2007). U manioku jedlého se podařilo získat 4,35 % tetraploidů při koncentraci oryzalinu 3 $\mu\text{mol. l}^{-1}$ aplikovaného na apikální explantáty (Carvalho et al., 2016). U stejného druhu rostliny *Phlox paniculata*, kterému se věnuje tato práce, byla navozována polyploidie pomocí oryzalinu již dříve, a to u kultivaru ´Fujiyama´ syn. Fuji, kdy se podařilo získat 4,17 % tetraploidních rostlin při koncentraci oryzalinu 40 $\mu\text{mol. l}^{-1}$ (Matiska, Vejsadová, 2009). Tato ověřená tetraploidní odrůda byla použita jako standard pro tuto práci. Byly pozorovány rozdíly v listové morfologii mezi tetraploidními a diploidními rostlinami po jejich převedení do *ex situ* podmínek. Autoři se domnívají, že tmavší barva listů u tetraploidních rostlin by mohla být způsobena vyšším obsahem chlorofylů.

Pro tuto domněnku byla proto úroveň ploidy nejprve ověřována měřením obsahu chlorofylů. Rovněž byly sledovány morfologické znaky jednotlivých rostlin, kdy se u tetraploidních rostlin předpokládá vyšší obsah chlorofylů. Pro porovnání byla použita diploidní odrůda Fuji a z ní odvozený tetraploid Fujix.

Pokud by se získala dostatečně průkazná data na základě poměrných hodnot obsahů chlorofylů, nemusely by se vzorky zkoumat pomocí průtokového cytometru, u kterého je zapotřebí vynaložit vysoké náklady, naproti tomu pomocí cytometru jsou vždy spolehlivé výsledky detekce. Avšak naměřené hodnoty obsahu chlorofylů vždy neodpovídaly intenzitě zbarvení listů a byly také zaznamenány značné rozdíly v hodnotách chlorofylů mezi odrůdami. Z tohoto důvodu bylo nutné přistoupit k měření průtokovým cytometrem a spolehlivě tak detekovat diploidní a tetraploidní rostliny. Například u rostliny č. 15, která se jevila jako tetraploidní s ohledem na vyšší obsah chlorofylů se nakonec ukázalo, že tetraploidní nebyla, naproti tomu vzorek číslo 2, který nevykazoval tak vysokou hladinu chlorofylů oproti kontrolní rostlině, tetraploidní byl. Z výsledků této práce se ukázalo, že porovnávání obsahu chlorofylů není spolehlivé pro detekci úrovně ploidy. Možným neúspěchem při měření chlorofylů by mohl být nedokončený vývoj listů v podmínkách *in vitro*. Ze stejného důvodu je u rostlin pěstovaných v *in vitro* podmínkách složité provést

měření délky svěřacích buněk průduchů a stanovení počtu chloroplastů. Je možné, že kdyby *in vitro* rostliny byly převedeny do venkovních podmínek, byly by při měření obsahu chlorofylů naměřeny průkaznější hodnoty pro detekci polyploidie. Z důvodu problematického získávání směrodatných dat obsahu chlorofylů bylo nepřesné i statistické vyhodnocení výsledků. Na základě statistické analýzy byly vyhodnoceny rostliny číslo 1, 15 a 16 u odrůdy Miss pepper a rostlina číslo 1 u odrůdy Marge jako průkazně se lišící rostliny, a tedy potenciálně rostliny se zvýšenou ploidií. Z výsledků na průtokovém cytometru se však tetraploidie potvrdila pouze u rostliny číslo 1 u odrůdy Miss pepper.

Z měření na průtokovém cytometru jsme u odrůdy Marge z 54 zkoumaných rostlin neodhalily žádnou tetraploidní rostlinu, u odrůdy Miss pepper se ze 48 zkoumaných rostlin podařilo odhalit 10 tetraploidních rostlin.

7. Závěr

Cílem této práce bylo získání tetraploidů u okrasných rostlin *Phlox paniculata* kultivarů: Miss pepper, Marge, Fuji, Fujix, Lichtcom, Windsor a Dragon aplikací oryzalinu. Byly použity dva způsoby navozování polyploidie, jednak bylo navozování polyploidie na listových segmentech odebraných přímo ze sazenic *Phlox paniculata* rostoucích ve skleníku a při pokusu teprve následoval převod do *in vitro* podmínek a druhý způsob bylo navozování ploidie na listových segmentech z rostlin již předem napěstovaných v podmínkách *in vitro*.

V této práci se potvrdily některé výsledky již dříve publikované. Potvrdilo se problematické založení pokusů s navozením polyploidie při přímém využití rostlin z nesterilních podmínek. Podařilo se pouze získat rostoucí explantáty od odrůdy Marge vhodné k měření chlorofylů a následně i k měření na průtokovém cytometru. Bohužel se však u žádné ze zkoumaných rostlin této odrůdy nepodařilo získat tetraploidní rostlinu.

U založení pokusů z rostlin napěstovaných v *in vitro* podmínkách došlo k vytvoření kalusů z listových segmentů po infiltraci oryzalinu u odrůd Windsor, Lichtcom a Miss pepper. Vzhledem k časové náročnosti napěstování výhonů z kalusů, se pro tuto práci podařilo získat hodnotitelné rostliny na testování ploidie pouze od odrůdy Miss pepper, která se ukázala ze všech odrůd jako nejvitálnější. Tyto rostliny byly podrobeny testování obsahu chlorofylů pomocí chlorofylmetru (CCM200) a zjišťování úrovně ploidie na průtokovém cytometru. Právě detekce na průtokovém cytometru se ukázala jako nejspolehlivější metoda pro určení umělého namnožení počtu chromozómů. Výsledky získané měřením chlorofylů se u zkoumaných odrůd ukázaly jako nesměrodatné a mohly sloužit pouze k orientačnímu odhadu. Ale u kontrolních odrůd se předpoklad částečně naplnil a byly u tetraploidní odrůdy Fujix zaznamenány vyšší hodnoty chlorofylů oproti diploidní odrůdě Fuji, nejednalo se však o statisticky průkazná data. Možná by metoda měření obsahu chlorofylů byla průkaznější při převedení rostlin do venkovních podmínek. Jako nejspolehlivější metoda detekce se ukázala ověřená metoda na průtokovém cytometru, kde bylo detekováno 10 tetraploidních rostlin u odrůdy Miss pepper.

8. Seznam použité literatury

ALLUM J. F, BRIGLOE D. H., ROBERTS A. V. *Chromosome doubling in Rosa rugosa Thunb. Hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time*, 2007. Plant Cell Report.

BÖHM, Č. 1991. *Trvalky: ozdoba zahrady i bytu*. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha, 1991. 112 s. ISB: 8085362066

CARVALHO M. DE J., GOMES V. B., SOUZA A. DA S., SANTOS-SEREJO J. A., OLIVEIRA. *Inducing autotetraploids in cassava using oryzalin and colchicine and their in vitro morphophysiological effects*, 2016. Genetics and Molecular Research. Brasil.

CONTRERAS R. N., RUTTER J.M. *An Oryzalin-induced Autoalloctoploid of Hibiscus acetosella 'Panama Red'*, 2009. Department of Horticulture, The university of Georgia, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134(5):553-559. Tifton.

ČERNOHORSKÝ, Z. *Základy rostlinné morfologie*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha, 1967. 216 s. ISBN: 76-06-00

D'AMATO, F. *Nuclear Cytology in Relation to Developmenr*, 1977. Cambridge University Press. 283 s.

DEFIANI M. R., SUPRAPTA D.N., SUDANA I. M., RISTIATI N. P. *Oryzalin Treatment Modified Plant Morphology of Impatiens balsamina*, 2013. L. Current World Environment, Vol. 8(1), 23-27. Singaraja Bali

DOSTÁL, J. *Nová Květena ČSSR*. Academia. Praha, 1989. 1548 s. ISBN 80-200-0095x

EECKHAUT T., WERBROUCK S., LEUS L., VAN BOCKSTAELE E., DEBERGH P. *Chemically induced polyploidization in Spathiphyllum wallisii Regel through somatic embryogenesis*, 2004. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78. p. 241-246

- ESCADÓN A., HAGIWARA J. ALDERETE L. *A new variety of Bacopa monnieri obtained by in vitro polyploidization*, 2006. *Electronic J Biotechnology* 9(3). P. 181-186.
- GOLOVKIN, B. N., KLIKOVÁ, G. A KOL. *Trvalky: rozkvetlá zahrada (1)*. Lidové nakladatelství. Praha, 1990. 352 s. ISBN: 8070220538
- GREPLOVÁ M., POLZEROVÁ H., DOMKÁŘOVÁ J. *Metodika mitotické poliploidizace in vitro*, 2009. Součást výstupu V009v rámci projektu NAZV QF4133. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod.
- HANCOCK J. *The colchicine story*, 1997. *Hort Science* 32: p.1011-1012.
- HANSEN J., ANDERSON S. *In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin and APM in Brassica napus microspore culture*, 1996. *Euphytica* 88: p. 159-164.
- KONOPIKOVÁ A. *Tvorba tetraploidních odrůd u druhu Phlox paniculata v podmínkách in vitro*, 2016. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 48 s.
- KUTINA, J. *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*, 1988. 2. Vydání. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 416 s. ISBN: 0702888
- LAM, H.K. HARBAR D J.L., KOUTOULIS A. *Tetraploid induction of Acacia crassicarpa using colchicine and oryzalin*, 2014. *Journal of Tropical Forest Science* Vol. 26, No. 3 (July 2014), pp. 347-354. Malaysia
- MATISKA P., VEJSADOVÁ H. *Polyploidy Induction In Phlox paniculata L. Under in vitro Conditions*, 2009. *Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun.*, 2010, LVIII, No. 1, pp. 101-106. Brno
- MATISKA, P. *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, 2009. 199 s.
- MATISKA, P. *Ústní sdělení*, Praha, 2016.

MILLER C. O. Similarity of some kinetin and red light effects, 1956. *Plant Physiology*, Vol. 31, p. 318–319.

MUHAMMAD O., ISHFAQ A. H., NADEEM A. A., MALIK M., NABEELA B. *Effect of different concentrations of oryzalin on in vitro growth of explants of olive CV moraiolo*, *Scholarly Journal of agricultural*, 2014. Science Vol. 4(1), pp. 51-59. Agriculture University Rawalpindi.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, 1962. *Physiologia Plantarum*, 15. p. 473-497.

NOVÁK, F. J. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia. Praha, 1990. 208 s. ISBN: 8020003444

NOVÁK, J., SKALICKÝ, M. *Botanika: cytologie, histologie organologie, systematika*. 3. Vydání. Powerprint, Praha, 2012. 336 s. ISBN: 9788087415535

NOVÁK F. A. *Velký obrazový atlas rostlin*. 2. Vydání. Nakladatelství Artia. Praha, 1981. 590 s. ISBN: 37-005-81

PORRA RJ., THOMPSON WA., KRIEDEMANN PE. *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*, 2001. *Biochim Biophys Acta* 1989,975:384-94.

PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J. A KOL. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha, 1998. 460 s. ISBN: 8020005862

ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. Scientia. Praha, 2003. 824 s. ISBN: 8071832685

SKOOG, F. MILLER, C.O. *Symp. Soc. Exp*, 1957. *Biol.* 11. 118 s.

ŠEBÁNEK J., SLADKÝ Z. *Biotechnologie rostlinných explantátů*. Vysoká škola zemědělská. Brno, 1988. 100 s. ISBN: 1140

ŠESTÁK, Z.; ČATSKÝ, J.; AVRATOVŠČUKOVÁ, N.; BARTOŠ, J.; JANÁČ, J.; KUBÍN, Š.; KVĚT, J.; NEČAS, J.; SLAVÍK, B.; SMETÁNKOVÁ, M.; ŠETLÍK, I.; VOZNĚSENSKIJ, V.L. *Metody studia fotosynthetické produkce rostlin*. SZN Praha, 1966.

TILDEN P. MIGUEL, KENNETH W. LEONHARDT, *In vitro polyploid induction of orchids using oryzalin*, Scientia Horticulturae, Volume 130, Issue 1, 26 August 2011, Pages 314-319

Elektronické zdroje:

Anonym 1. *Phlox paniculata a jeho patogeny*. [online]. [cit. 2017-3-4]. Dostupné z: <http://zahradaweb.cz/patogeny-plamenky/>

Anonym 2. *Průtokový cytometr Olomouc* [online]. [cit. 2017-3-10]. Dostupné z: <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/45>

Anonym 3. *Zásady pěstování u Phlox paniculata* [online]. [cit. 2017-3-4]. Dostupné z: <http://abecedazahrady.dama.cz/clanek/plamenky-zasady-jejich-pestovani>

9. Použité zkratky

MS – Murashige and Skoog medium

TDZ – thidiazuron

IAA – kyselina inodyl-3-octová RRR – regulátor rostlinného růstu

M. p. – Miss pepper

FCM – Flow cytometric method

k.– kontrolní varianta

10. Seznam grafů a tabulek:

Tabulka 1: Základní komponenty MS média

Tabulka 2: Počty zregenerovaných segmentů u odrůd Marge a Dragon

Tabulka 3: Počty zregenerovaných listových segmentů u druhého pokusu

Tabulka 4: Počty zregenerovaných listových segmentů u třetího pokusu

Tabulka 5: 1. měření hodnot chlorofylů u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Tabulka 6: 2. měření hodnot chlorofylů u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Tabulka 7: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Marge

Tabulka 8: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Miss pepper (první část)

Tabulka 9: Výsledky měření obsahů chlorofylů u odrůdy Miss pepper (druhá část)

Tabulka 10: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů získaných metodou Porra u diploidní odrůdy Fuji a tetraploidní odrůdy Fujix

Tabulka 11: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidů u rostlin odrůdy Marge

Tabulka 12: Obsahy chlorofylů a i b a karotenoidu u rostlin odrůdy Miss pepper

Tabulka 13: Výsledky z měření průtokovým cytometrem

Tabulka 14: Koncentrace oryzalinu a časové varianty u získaných tetraploidů u odrůdy Miss pepper

Graf 1: Výstup z programu Statistica 12, grafické znázornění hodnot chlorofylů u testovaných rostlin

Graf 2: Výstup z programu Statistica 12, grafické znázornění porovnání obsahů chlorofylu (a, b) a karotenoidů u testovaných rostlin

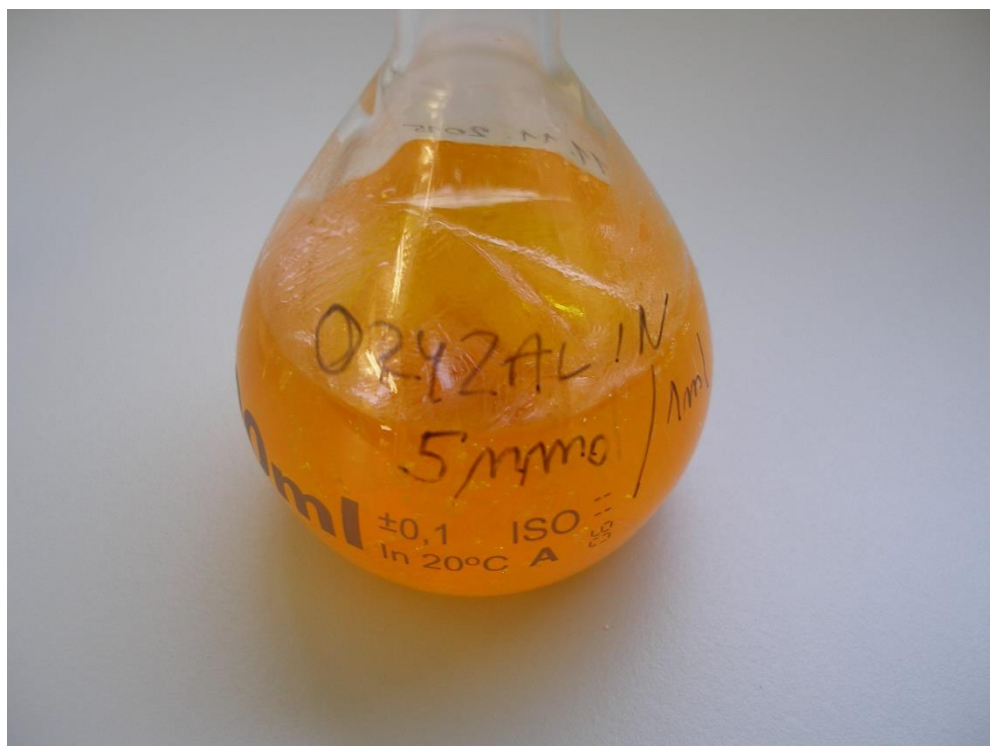
11. Přílohy:



Obrázek 1: Laboratorní váha



Obrázek 2: Připravené zásobní roztoky pro přípravu MS média



Obrázek 3: Připravený roztok oryzalinu



Obrázek 4: pH metr



Obrázek 5: Autokláv



Obrázek 6: Flow box



Obrázek 7: Stojan se zářivkami pro kultivaci rostlin *in vitro*



Obrázek 8: Zregenerované rostliny z kalusů



Obrázek 9: Vzorky listů připravené pro měření chlorofylů a zjišťování tetraploidů v průtokovém cytometru

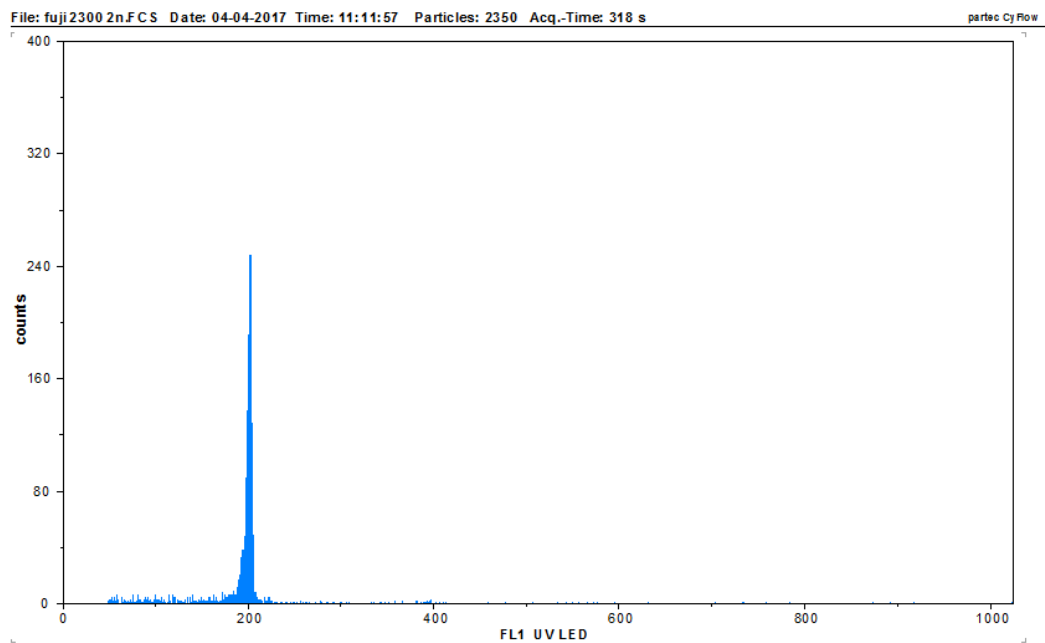


Obrázek 10: Průtokový cytometr

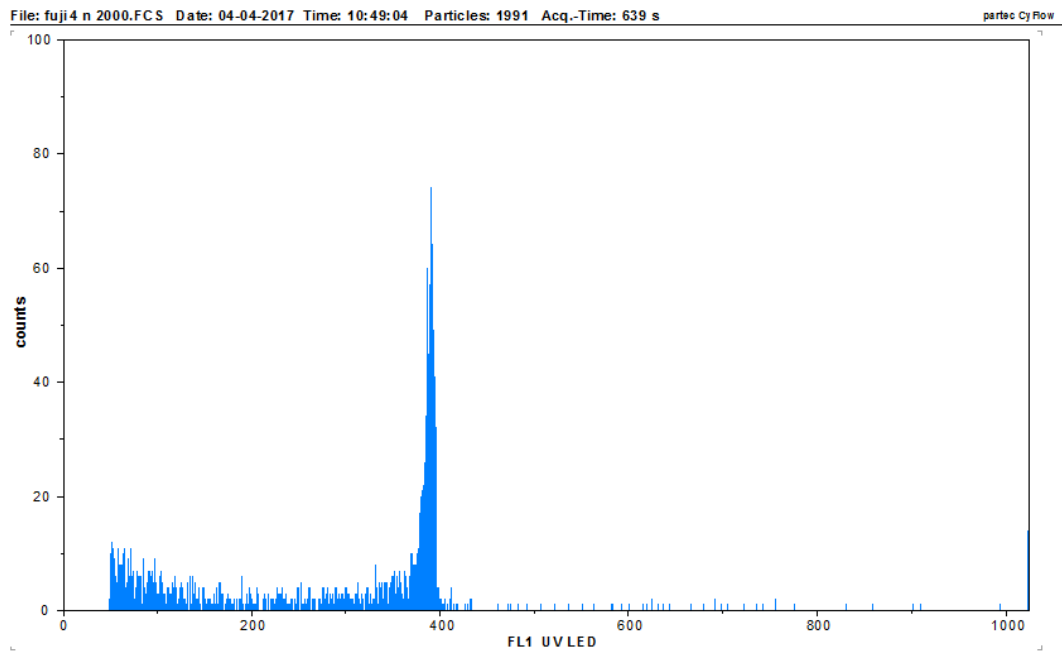


Obrázek 11: *Phlox paniculata*

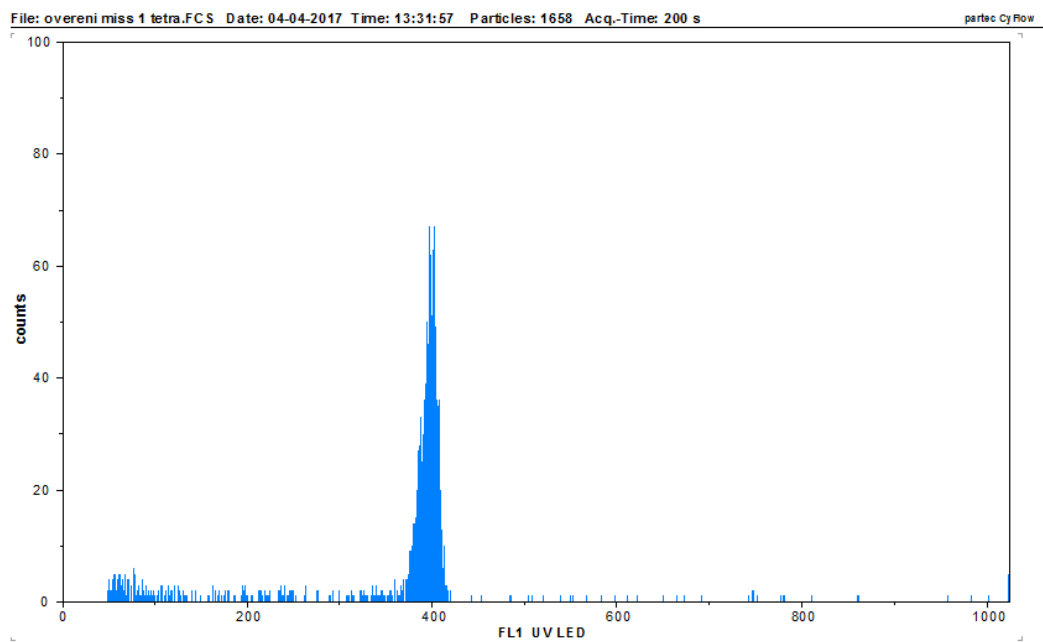
Histogramy z měření průtokovým cytometrem:



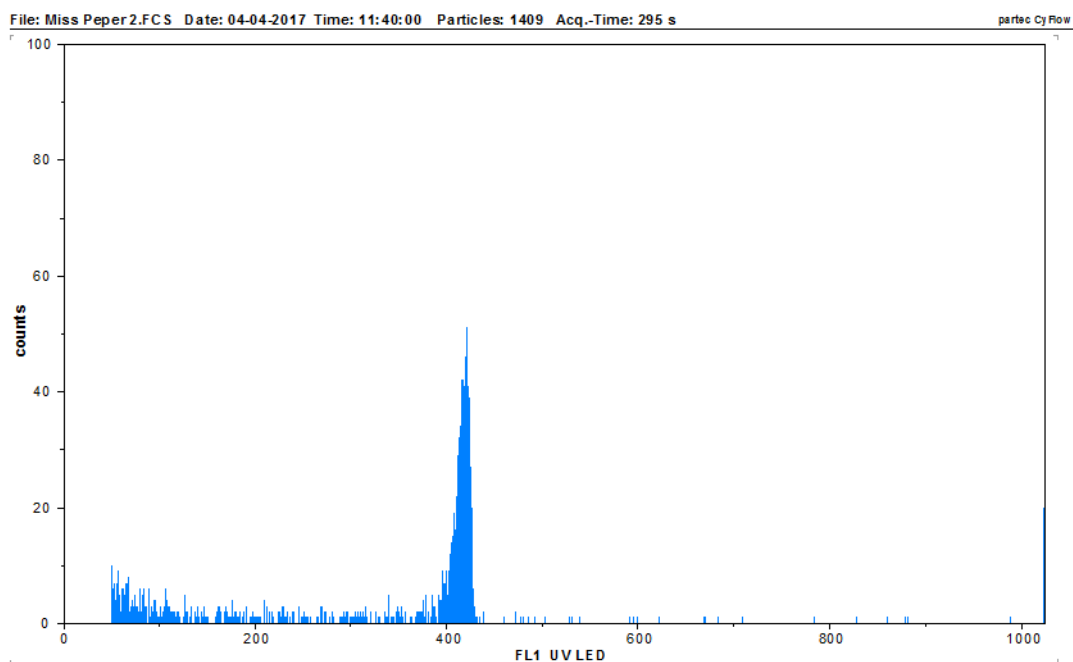
Graf A: Kontrolní diploidní odrůda Fuji



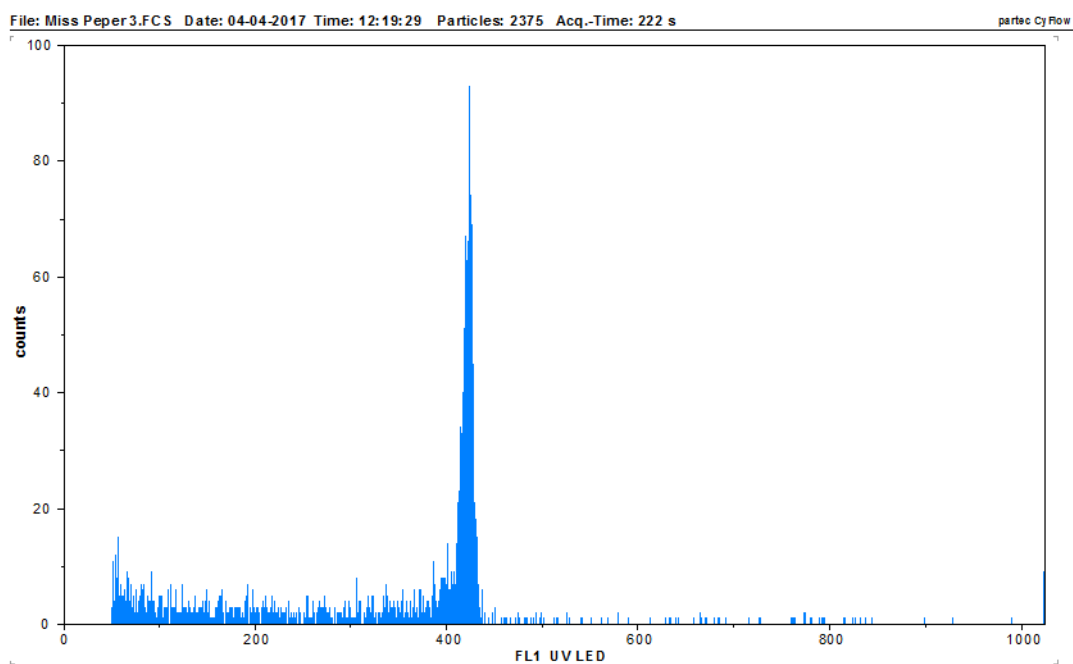
graf B: Kontrolní tetraploidní odrůda Fujix



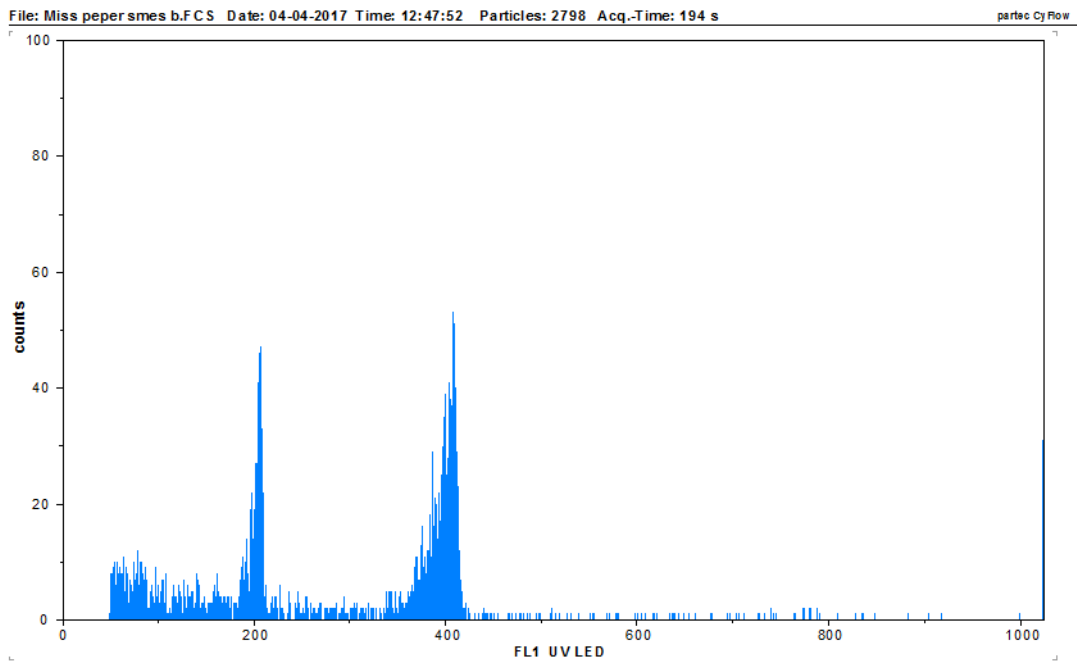
Graf C: Tetraploidní rostlina č. 1 od odrůdy Miss pepper



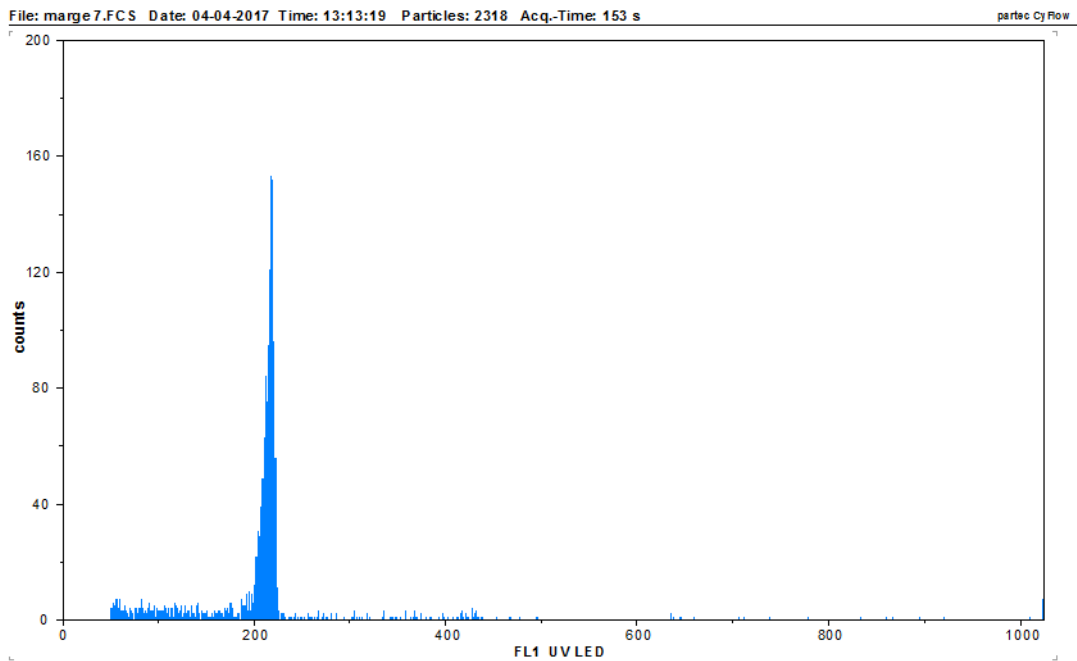
Graf D: Tetraploidní rostlina č. 2 od odrůdy Miss pepper



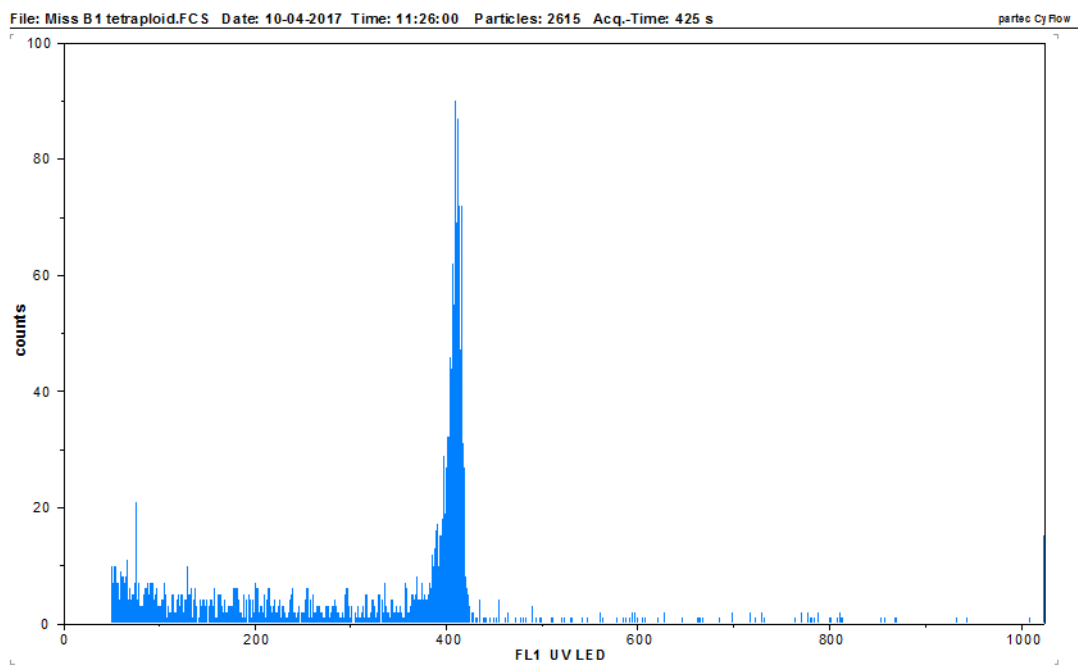
Graf E: Tetraploidní rostlina č. 3 od odrůdy Miss pepper



Graf F: Směsný vzorek B odrůdy Miss pepper s tetraploidními rostlinami



Graf G: Diploidní rostlina odrůdy Marge



Graf H: Odhalená tetraploidní rostlina při měření jednotlivých rostlin ze směsných vzorků.

Duncanuv test; promenná chlor (m ěření chlorofylů) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PC = 1,4721, sv = 210,00								
C. bunky	odruda	chlor Prumer	1	2	3	4	5	6
22	M.P. 8	0,67500	****					
27	M.P. 13	0,90000	****	****				
1	Fuji	0,93000	****	****				
28	M.P. 13	1,00000	****	****				
29	M.P. 14	1,01111	****	****				
20	M.P. 6	1,02222	****	****				
17	M.P. 3	1,02500	****	****				
9	Marge 5	1,12500	****	****				
36	M.P. 20	1,14000	****	****				
7	Marge3	1,20000	****	****				
26	M.P. 12	1,21429	****	****				
21	M.P. 7	1,28889	****	****				
5	Marge 2	1,32500	****	****				
24	M.P. 10	1,34444	****	****				
25	M.P. 11	1,35000	****	****				
19	M. P. 5	1,46000	****	****				
32	M.P. 17	1,46000	****	****				
34	M.P. 19	1,68000	****	****				
18	M.P. 4	1,70000	****	****				
6	Marge 3	1,70000	****	****				
2	Fujix	1,77500	****	****				
3	Marge Kon	1,78571	****	****				
23	M.P. 9	1,85714	****	****				
33	M.P. 18	1,98000	****	****				
35	M.P. 19	2,00000	****	****				
8	Marge 4	2,01250	****	****				
16	M.P. 2	2,02857	****	****				
10	Marge 6	2,03333	****	****				
12	Marge 8	2,32500	****	****				
14	M.P. Kontrola	2,58571	****	****	****			
13	Marge 9	2,64286	****	****	****			
11	Marge 7	2,95714		****	****			
4	Marge 1	4,32857			****	****		
15	M.P.1	5,13333				****		
31	M.P. 16	7,35455					****	
30	M.P.15	11,72727						****

Tabulka A: Výstup z programu Statistica 12, Duncanův test pro celkový chlorofyl

Duncanuv test; promenná chlorofyl a (stat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PC = ,03358, sv = 4,0000																				
C. bunky	odruda	chlorofyl a Prumer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
21	M.P. 8	0,077700	****																	
19	M.P. 6	0,086600	****																	
20	M.P. 7	0,385300	***	****																
1	Fuji	0,453940	***	***	****															
2	Fujix	0,681957	***	***	***	****														
13	M.P. Kon	0,848500	***	***	***	****														
12	Marge 9	1,114270		***	***	***	****													
8	Marge 5	1,249380			***	***	****													
27	M.P. 14	1,334000			***	***	****													
18	M.P. 5	1,481900				***	***	****												
5	Marge 2	1,693800					***	***	****											
30	M.P. 17	1,774700					***	***	****											
15	M.P. 2	1,795600					***	***	****											
9	Marge 6	2,174760						***	***	****										
26	M.P. 13	2,250300						***	****											
7	Marge 4	2,576900							***	****										
24	M.P. 11	2,730300								***	****									
16	M.P. 3	2,811300								***	***	****								
14	M.P. 1	3,193530									***	***	****							
6	Marge 3	3,473900										***	***	****						
25	M.P. 12	3,560100											***	****						
4	Marge1	3,605400												***	****					
3	Marge Kon.	4,005000													****	****				
28	M.P. 15	4,157000													****	****				
29	M.P. 16	4,181100													****	****				
22	M.P. 9	4,340600													****	****				
31	M.P. 18	4,444900													****	****				
10	Marge 7	4,614400													****	***	****			
32	M.P. 19	5,008600														***	***	****		
23	M.P. 10	5,173000															***	****		
17	M.P. 4	5,562400																****		
11	Marge 8	6,448260																		****
33	M.P. 20	6,488200																		****

Tabulka B: Výstup z programu Statistica 12, Duncanův test pro chlorofyl a

		Duncanuv test; promenná chlorofyl b (stat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PC = ,00149, sv = 4,0000															
C. bunky	odruda	chlorofyl b Prumer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
19	M.P. 6	0,023300	****														
1	Fuji	0,059880	****														
21	M.P. 8	0,074000	****														
20	M.P. 7	0,136000	***	****													
2	Fujix	0,262593		***	****												
8	Marge 5	0,311560			****												
12	Marge 9	0,386020			****												
7	Marge 4	0,552280				****											
30	M.P. 17	0,566200				****											
27	M.P. 14	0,569500				****											
15	M.P. 2	0,577300				****											
26	M.P. 13	0,626500				***	****										
5	Marge 2	0,658000				***	****										
6	Marge 3	0,733960					***	****									
9	Marge 6	0,754880					***	****									
4	Marge1	0,758520					***	****									
13	M.P. Kon	0,863400						***	****								
16	M.P. 3	0,944900							****								
24	M.P. 11	0,958200							****								
22	M.P. 9	0,966900							****								
28	M.P. 15	1,139100								****							
10	Marge 7	1,245920								***	****						
25	M.P. 12	1,362400									****						
17	M.P. 4	1,387300									****						
32	M.P. 19	1,397800									****						
3	Marge Kon.	1,552200										****					
23	M.P. 10	1,564200										****					
33	M.P. 20	1,752300											****				
11	Marge 8	1,944200												****			
18	M.P. 5	2,070900												***	****		
14	M.P. 1	2,155500													****		
29	M.P. 16	3,237000														****	
31	M.P. 18	6,369300															***

Tabulka C: Výstup z programu Statistica 12, Duncanův test pro chlorofyl b

Duncanuv test; promenná karotenoidy (stat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PC = ,00633, sv = 4,0000																			
	odruda	kar. prum.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
C. b																			
21	M.P. 8	0,019000	****																
19	M.P. 6	0,094300	****																
1	Fuji	0,102440	****																
20	M.P. 7	0,175200	****	****															
18	M.P. 5	0,235800	****	****	****														
13	M.P. Kon	0,239000	****	****	****														
12	Marge 9	0,263600	****	****	****														
27	M.P. 14	0,416700		****	****	****													
8	Marge 5	0,424400		****	****	****													
15	M.P. 2	0,454300		****	****	****	****												
2	Fujix	0,514900			****	****	****	****											
5	Marge 2	0,596000				****	****	****	****										
26	M.P. 13	0,600500				****	****	****	****										
7	Marge 4	0,600530				****	****	****	****										
9	Marge 6	0,676900				****	****	****	****	****									
16	M.P. 3	0,741400					****	****	****	****	****								
30	M.P. 17	0,782500						****	****	****	****	****							
24	M.P. 11	0,793000						****	****	****	****	****	****						
14	M.P. 1	0,861100							****	****	****	****	****	****					
4	Marge 1	0,963700							****	****	****	****	****	****	****				
6	Marge 3	0,984000							****	****	****	****	****	****	****				
29	M.P. 16	1,040900							****	****	****	****	****	****					
28	M.P. 15	1,063300								****	****	****	****	****	****				
31	M.P. 18	1,085700								****	****	****	****	****	****				
3	Marge Kon.	1,092360									****	****	****	****	****				
22	M.P. 9	1,098700										****	****	****	****				
25	M.P. 12	1,108500											****	****	****				
10	Marge 7	1,254600												****	****	****			
32	M.P. 19	1,354100													****	****	****		
17	M.P. 4	1,495900														****	****	****	****
11	Marge 8	1,557200														****	****	****	****
23	M.P. 10	1,579200															****	****	****
33	M.P. 20	1,742900																	****

Tabulka D: Výstup z programu Statistica 12, Duncanův test pro karotenoidy