

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Pěstování pšenice seté v podmínkách *in vitro*

Bakalářská práce

**Václav Venzhöfer
Rostlinná produkce**

PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Pěstování pšenice seté v podmínkách *in vitro*" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28. dubna 2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, pomoc a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce.

Pěstování pšenice seté v podmínkách *in vitro*

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejpěstovanějších plodin světa. Celosvětová produkce dosahuje stovek milionů tun a je nedílnou součástí potravy obyvatel naší planety. Podmínky *in vitro* umožňují testování a zkoumání živých rostlinných buněk mimo celou rostlinu, což lze využít právě i u různých hospodářských plodin.

V bakalářské práci byl sledován vliv regulátorů růstu a stresových podmínek způsobených zasolením na přírůstek hmoty kalusové kultury a produkci sekundárních metabolitů. Tato *in vitro* kultura byla odvozena z hypokotylu pšenice seté odrůdy 'Bohemia' na mediu dle Murashige & Skoog s 4 mg/l 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4-D). V rámci testování regulátorů růstu byly testovány u vzniklých kalusů jak různé koncentrace 2,4-D, tak i další látky ze skupiny cytokininů (BAP, kinetin) o koncentracích 0,1; 0,5 a 1,0 mg/l. U všech různých kombinací auxinů a cytokininů byl zaznamenán pozitivní vliv na přírůstek hmoty kalusu až na koncentraci s 8 mg/l kyseliny 2,4-D a 0,5 mg/l kinetinu. Výsledky měření ukázaly, že pro pěstování kalusu odrůdy pšenice seté 'Bohemia' byla nejlepší kombinace 8 mg/l 2,4-D a 1 mg/l BAP. Kalusová kultura byla také vystavena solnému stresu, kdy byl do živného media přidán NaCl s výslednou koncentrací 50; 100 a 200 mmol/l.

Přidání NaCl mělo negativní vliv na přírůstek čerstvé váhy kalusu, zatímco obsah flavonoidů se mírně zvýšil. Z toho vyplývá, že přítomnost soli vedlo k tvorbě flavonoidů, které pomáhají rostlinám zvládnout stresu.

Klíčová slova: *Triticum aestivum*, kalus, kultivace, regulátory růstu, sekundární metabolity

***In vitro* cultivation of *Triticum aestivum* L.**

Summary

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most widely grown crops in the world. Worldwide production reaches hundreds of millions of tonnes and is an integral part of the food of the inhabitants of our planet. *In vitro* conditions allow the testing and examination of living plant cells outside the whole plant, which can be used for various economic crops.

In the bachelor thesis, the effect of growth regulators and stress conditions caused by salinity on the mass gain of callus culture and the production of secondary metabolites was investigated. This *in vitro* culture was derived from hypocotyls of wheat cultivar 'Bohemia' on Murashige & Skoog medium with 4 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In order to test growth regulators, the resulting callus cultures were tested for different concentrations of 2,4-D as well as other substances from the cytokinin group (BAP, kinetin) at concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 mg/l. For all different combinations of auxins and cytokinins, a positive effect on callus mass gain was observed up to concentrations with 8 mg/l of 2,4-D and 0.5 mg/l of kinetin. The results showed that the best combination for growing callus of the seed wheat variety 'Bohemia' was 8 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BAP. The callus culture was also subjected to salt stress, when NaCl was added to the nutrient medium with resulting concentrations of 50; 100 and 200 mmol/l.

The addition of NaCl had a negative effect on the fresh weight gain of callus, while the flavonoid content increased slightly. This implies that the presence of salt led to the production of flavonoids which help the plants to cope with stress.

Keywords: *Triticum aestivum*, callus, cultivation, growth regulators, secondary metabolites

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Obecná charakteristika	10
3.1.1	Obiloviny	10
3.1.2	Pšenice setá	10
3.1.2.1	Historie	12
3.1.2.2	Agroekologické podmínky a pěstební požadavky	12
3.1.2.3	Choroby	13
3.1.2.4	Škůdci	14
3.2	Pěstování <i>in vitro</i>	14
3.2.1	Historie kultivace <i>in vitro</i>	14
3.2.2	Využití <i>in vitro</i> pěstování	15
3.2.2.1	Mikropropagace	15
3.2.2.2	Ozdravování rostlin od viróz	15
3.2.2.3	Somatická hybridizace	16
3.2.2.4	Produkce sekundárních metabolitů	16
3.2.3	Kalusové kultury	16
3.3	Fytohormony	17
3.3.1	Auxiny	18
3.3.2	Cytokininy	19
3.3.3	Gibereliny	19
3.3.4	Strigolaktony	20
3.3.5	Kyselina abscisová	20
3.3.6	Ethylen	20
3.3.7	Brassinostreoidy	20
3.4	Stres	21
3.4.1	Abiotický stres	21
3.4.2	Stres ze zasolení	21
3.4.3	Osmotický stres	22
3.5	Rostlinné polyfenoly	22
3.5.1	Flavonoidy	23
4	Metodika	24
4.1	Rostlinný materiál	24
4.2	Laboratorní pomůcky, kapaliny, přístroje	24
4.3	Živné medium	25

4.4	Provedení pokusu	25
4.5	Vyhodnocení výsledku	27
5	Výsledky	28
5.1	Vliv kyseliny 2,4-D na růst kalusu	28
5.2	Vliv cytokininu na růst kalusu	30
5.3	Vliv solného stresu.....	32
6	Diskuze.....	34
7	Závěr	37
8	Literatura	38
9	Seznam obrázků a grafů	43
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	44
11	Samostatné přílohy	45

1 Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejvýznamnějších obilnin celého světa. Je základní potravinou obyvatel planety Země a velkou měrou se také podílí na výživě hospodářských zvířat. Pěstování pšenice seté je často vystaveno různým nepříznivým podmínkám, které mohou nastat v důsledku působení abiotických (vysoké či nízké teploty, nedostatek vody, xenobiotika) či biotických (škůdci, choroby) stresových faktorů. Tyto vlivy mají za následek strádání rostliny, jež vede ke snížení kvality a produkce plodiny. V souvislosti s těmito problémy se zkoumá odolnost plodin a jejich odrůd vůči těmto stresorům. Jednou z možností pro tento výzkum spočívá ve využití pěstování rostlin v podmínkách *in vitro* pomocí kalusových kultur.

Kalusová kultura umožňuje studium chování živých rostlinných buněk mimo celou rostlinu. *In vitro* kultivace poskytuje úplnou kontrolu nad podmínkami prostředí. Umožňuje studovat růstové a morfologické vlastnosti rostliny do detailu a testovat její reakci na různé stimuly.

Cílem bakalářské práce bylo odvodit a zhodnotit vliv vybraných fytohormonů ze skupiny auxinů a cytokininů na růst kalusu odvozeného z pšenice seté odrůdy 'Bohemia'. Dále byl sledován vliv stresových podmínek na růst kalusu, konkrétně zasolení. Byla také sledována produkce sekundárních metabolitů (flavonoidů) u jednotlivých pokusných variant.

2 Cíl práce

Cílem práce bude odvození kalusové kultury z pšenice seté 'Bohemia' a sledování přírůstku hmotnosti a produkce sekundárních metabolitů pod vlivem regulátorů růstu přidávaných do živného media.

Nulová hypotéza: Vybrané látky nebudou mít vliv na růst kalusu a tvorbu sekundárních metabolitů.

Alternativní hypotéza: Alespoň jeden z testovaných regulátorů růstu v určité koncentraci nebo jejich kombinaci ovlivní sledované parametry.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná charakteristika

3.1.1 Obiloviny

Jako obilniny jsou označovány rostliny patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), ve které se nachází přibližně 700 rodů s více než 11 000 druhy, které rostou po celém světě. Obilniny jsou významné pro zemědělství, slouží nejen jako potrava pro obyvatele celé planety a krmivo pro zvířata, ale i k dalšímu zpracování v průmyslu. Celosvětově nejvýznamnějšími obilninami jsou pšenice, rýže, kukuřice a ječmen. Zaujímají od počátku zemědělství nezastupitelnou část lidské výživy a ve vyspělých zemích tvoří až polovinu celkového příjmu energetické potřeby a až třetinu bílkovin. Obsahují také významné množství minerálních látek – fosforu, vápníku a hořčíku. Jsou významné také pro svůj obsah skupiny vitamínů B. Dalšími významnými obilninami jsou žito, oves, žitovec, proso, čirok, mohár a čumíza (Belitz et al. 2009)

Mezi obilniny se také řadí tzv. pseudoobilniny, které mají podobné vlastnosti a použití jako klasické obilniny, ovšem nepatří do čeledi lipnicovité. Pseudocereálie mají často vysoký obsah sacharidů, bílkovin, minerálních látek a neobsahují lepek, což z nich činí populární volbu pro jedince s bezlepkovou dietou nebo se využívají z důvodu zvýšení pestrosti stravy. Základními druhy jsou merlík chilský (*Chenopodium quinoa* Willd) a laskavec ocasatý (*Amaranthus caudatus* L.) patřící do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) a také pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench) patřící do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*) (Thakur & Kumar 2019).

3.1.2 Pšenice setá

Říše: rostliny (*Plantae*)

Oddělení: krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*)

Třída: rostliny jednoděložné (*Liliopsida*)

Řád: lipnicotvaré (*Poales*)

Čeď: lipnicovité (*Poaceae*)

Podčeď: lipnicové (*Pooideae*)

Rod: pšenice (*Triticum*)

Druh: pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejpěstovanějších obilnin. Pochází z oblasti Blízkého východu, známé jako oblast „Úrodného půlměsíce“. Odtud se plodina následně postupem času rozšířila do celého světa. Je to základní potravina obyvatel planety Země. Dle rozlohy je pšenice nejpěstovanější plodinou nejen v České republice, ale i po celém světě. Nedosahuje ovšem takových výnosů jako kukuřice a rýže, a proto se řadí až na třetí místo ve vyprodukovaném množství v celosvětovém měřítku (Das 2008). Dle Venclové (2023) se vyprodukované množství pšenice celosvětově pohybuje okolo 800 milionů tun zrna. V České republice se v roce 2022 vyprodukovalo 5 188,7 tisíc tun pšenice na rozloze 854,4 tisíc hektarů.

Pšenice je jednoletá, převážně přezimující nebo jarní obilnina. Tato samosprašná rostlina dorůstá do výšky od půl až do jednoho a půl metru. Stébla jsou dutá, tenkostěnná, tvořená obvykle pěti články, které jsou odděleny kolénky. Z kolének vyrůstá jeden úzký, protáhlý, čárkovitý, tmavě-zelený až modro-zelený list bez řapíku. Na jedné rostlině se zpravidla nenachází více jak pět stébel a každé stéblo nese generativní orgány. Květenstvím pšenice je čtyřhranný lichoklas, který se skládá z několika vícekvětých klásků, které vyrůstají z vřeten. Vřeteno je tuhé a nerozpadavé, dosahuje délky okolo deseti centimetrů. Plodem pšenice je nahá obilka.

Obilky jsou v závislosti na odrůdě okrouhlé až oválné. Barva je zlatožlutá až světlé žlutá. Po celé délce obilky se táhne mělká rýha (Obr. 1) Zralé suché obilky jsou nejbohatší na sacharidy, především na škrob. Zralá obilka může obsahovat více než 70 procent škrobu. Další významnou obsahovou složkou pšenice jsou bílkoviny, jejichž obsah se pohybuje v rozmezí 10–12 %. Významným celosvětovým produktem z pšenice je mouka, která je bohatá na lepek, a proto se využívá k pečení chleba a dalšího pečiva. V některých oblastech se z pšeničného sladu vyrábí pivo. Dalším významným využitím pšenice je jako krmivo pro hospodářská zvířata (Zimolka et al. 2005; Shevkani et al. 2017).

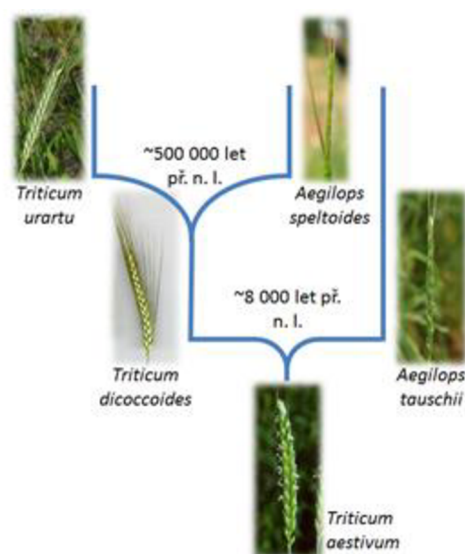


Obr. 1: Růst a vývoj pšenice seté (Stehlík et al. 1977)

3.1.2.1 Historie

Pšenice setá byla jednou z prvních domestikovaných potravinářských plodin a je již více jak 8 000 let základní potravinou lidské populace. Lidé začali konzumovat a sbírat divoce rostoucí pšenici před asi 10 000 lety. Postupem času si všimli možnosti pěstování této plodiny a začali ji aktivně vysévat. Postupným umělým výběrem počalo pozvolné šlechtění. Lidé upřednostňovali především rostliny s dlouhými klasy a velkými semeny. První domestikace pšenice se pravděpodobně odehrála v Mezopotámii. Na tomto území docházelo k přirozenému křížení různých druhů divoce rostoucí druhů (Grau 1998).

Dnešní pšenice setá obsahuje 42 chromozomů, oproti původním druhům, které měly chromozomů pouze 14. Dnešní moderní pšenice je tedy hexaploid s šesti sadami chromozomů (AABBDD). Pšenice jednozrná (*Triticum monococcum* L.) je nositelem genomu AA. Tento druh pravděpodobně tvořil základ pro další vývoj pšenice, jak jí známe dnes. Původ genomu BB není úplně jasný. Mohl by nejspíše pocházet z planě rostoucího mnohoštetu špaldovitého (*Aegilops speltoides* Coss.), jehož genom SS se proměnil mutací na zmiňovaný genom BB. Genomem DD do genetické informace dnešní pšenice přispěl mnohoštet Tauschův (*Aegilops tauschii* Coss.). Je považován za jednoho z hlavních předků moderní pšenice a hrál důležitou roli v procesu hybridizace a vzniku nových odrůd. Schéma vzniku pšenice seté popisuje Obr. 2 (Kumar et al. 2017).



Obr. 2: Fylogeneze pšenice seté (Doležel 2014)

3.1.2.2 Agroekologické podmínky a pěstební požadavky

Jak bylo uvedeno výše, pšenice se pěstuje téměř po celém světě, ale díky specifickým podmínkám stanovišť a zvolené technice zpracování půdy dosahuje rozdílných výnosů a rozdílné kvality zrna. Pšenice je nejnáročnější ze všech obilnin na výživu, půdní podmínky a také na předplodinu. Zpravidla je proto zařazována do osevního postupu hned za tzv. zlepšující plodiny. Na území ČR nejčastěji najdeme pšenici na poli, kde se minulý rok pěstovaly jeteloviny, luskoviny, olejninu nebo popřípadě brzy sklizené okopaniny. Nevhodnými předplodinami jsou všechny obilniny, zvláště pšenice samotná. Zvyšuje se tím riziko vyššího

výskytu chorob a škůdců (braničnatka pšeničná, rzi a kohoutek černý). Nejlépe se pšenici daří na středně těžkých až těžších půdách (písčito-hlinitých až jílovito-hlinitých). Nevhodnými půdami pro pěstování jsou lehké, rychle vysychavé půdy (písčité), silně kyselé a zamokřené půdy (Zimolka et al. 2005).

Ideálním rozmezím půdní reakce je pH pohybující se v rozmezí od slabě kyselého (6,2) do neutrálního (7,0). Dalším důležitým faktorem je dobrá zásoba živin v půdním profilu, což je základem dobrého výnosu. Pšenice na jednu tunu zrna odebere z půdního profilu v průměru 22–26 kg dusíku, 4,4–6,2 kg fosforu, 16,6–21,0 kg draslíku, 2,8–5,7 kg vápníku a 1,2–3,0 kg hořčíku. Dusík se pak dodává porostu i v průběhu vegetace z důvodu možného vyplavení. Je to nejdůležitější prvek pro výnos a jeho celková dávka je nejčastěji rozdělena do čtyř aplikací. Základní dávka se aplikuje před setím porostu. Následující tři aplikace se provádí již během samotného růstu plodiny. Regenerační dávka se aplikuje po přezimování porostu, po jeho odnožení následuje produkční přihnojení. Kvalitativní dávka je poslední aplikací a zajišťuje dobrý výnos a kvalitu zrna. Ostatní prvky se dodávají zpravidla do zásoby, při podzimním zpracování půdy (Vaněk et al. 2007).

Z hlediska klimatických podmínek se nároky v průběhu vegetace mění. Hlavními faktory jsou rozložení srážek, množství slunečního svitu a teplota. Porost musí přečkat zimu, a proto je důležitá teplota v okolí odnožovacího uzlu. Rozhodujícím faktorem na tom, zda rostlina přežije mrazivé období, je její odolnost, která je uložena v genetické informaci. Neméně důležité jsou ovšem další faktory během zimy. Ochlazování by mělo být postupné, rostliny se přizpůsobí na chladné počasí, dále přezimování ovlivňuje výška sněhové pokrývky, která funguje jako izolace před mrazem. Velikost rostliny a hloubka, ve které se nachází odnožovací uzel je stejně důležitá (Zimolka et al. 2005).

3.1.2.3 Choroby

Pšenici napadají virové i houbové choroby. Nejvýznamnější původci virových chorob jsou viry zakrslosti (*Wheat dwarf virus*). Příznaků si lze všimnout hlavně v období sloupkování, napadené rostliny mají kratší internodia a jsou tudíž i menší. Proti chorobě se nelze aktivně bránit, jelikož chorobu přenášejí mšice a křísci, zamezení šíření lze dosáhnout aplikací insekticidů na tento hmyz (Serfling et al. 2016)

Významnějším původcem chorob pšenice jsou houby patřící do skupiny *Basidiomycetes*. Jednou z chorob pat stébel je plíseň sněžná (*Monographella nivalis* Schaffnit), která se nejčastěji objevuje na jaře po roztání sněhu. Projevem je mezerovitost porostu, která je způsobena úhynem rostlin. Další z chorob stébel je stéblolam obilnin (*Pseudocercospora herpotrichoides* Fron). Napadá spodní část stébla, projevuje se oválnými protáhlými skvrnami. Oslabená rostlina se v místě napadení láme (Kazda et al. 2010).

Mezi choroby listů a klasů škodící na pšenici patří například rzi a braničnatka. Rzivost mohou způsobovat různé druhy jako rez plevová (*Puccinia striiformis* Westend), rez travní (*Puccinia graminis* Pers.) nebo rez pšeničná (*Puccinia triticina* Roberge ex Desm.). Napadají především praporcový list a stéblo při vysokém napadení přecházejí i do klasu. Příznakem jsou hnědě rezavé roztroušené kupičky na povrchu listů a stébel. Braničnatka plevová (*Stagonospora nodorum* Berk.) se projevuje nepravidelnými hnědými zasychajícími skvrnami

na listech. Na klasech se projevuje hnědofialovými skvrnami, hlavně na špičkách plev. Když je v období sklizně větší srážkový úhrn, může se v klasech objevit fuzariová spála obilnin (*Fusarium* ssp.). Ty jsou nebezpečné z hlediska produkce mykotoxinů a jejich následné konzumace. Fuzariózy jsou houbová onemocnění patřící do skupiny *Ascomycetes* (Serfling et al. 2016; Kazda et al. 2010).

3.1.2.4 Škůdci

Mezi nejvýznamnější škůdce lze uvést kyjatku travní (*Metopolophium dirhodum* Walker), kyjatku osenní (*Sitobion avenae* Fabricius) a mšici střemchovou (*Rhopalosiphum padi* L., patřící do čeledi mšicovití (*Aphididae*)). Mají bodavě savé ústní ústrojí, které využívají k sání na celé nadzemní části rostlin, kdy mohou také přenášet nebezpečné choroby. Dalším nebezpečným parazitem je kohoutek černý (*Oulema melanopus* L.). Jeho larvy i dospělci, okusují listy rostliny v podélných pruzích a obdobně škodí kohoutek modrý (*Oulema lichenis* Voet). Dále pšenici můžou napadnout bzunka ječná (*Oscinella frit* L.), hrbáč osení (*Zabrus tenebrioides* Goeze) nebo zelenuška žlutopásá (*Chlorops pumilionis* Brejk).

Velké ztráty na výnosu mohou napáchat i větší živočichové. V okolí svých nor škodí hlodavci, především okusem nebo celým spasením plodiny, nejvýznamnějším zástupcem tohoto řádu je hraboš polní (*Microtus arvalis* Pallas). Dále lze uvést i třídu ptáků, kteří se živí semeny a lesní zvěř, která okusuje zelené rostliny (Kazda et al. 1997).

3.2 Pěstování *in vitro*

3.2.1 Historie kultivace *in vitro*

Pěstování rostlin v podmínkách *in vitro* (nebo také *in vitro* kultivace) je proces, při kterém se rostliny, pletiva nebo samostatné buňky pěstují mimo své přirozené prostředí. *In vitro* pěstování probíhá především v laboratorních podmínkách. Vše probíhá ve sterilním prostředí dle definovaných fyzikálních a chemických podmínek (Thorpe 2007).

Historie pěstování v podmínkách *in vitro* sahá až na začátek 20. století, konkrétně do roku 1902. První teoretické základy pro pěstování rostlinných kultur uvedl rakouský vědec Gottlieb Haberland, kdy informoval o svých pokusech s pěstováním buněk před Německou akademií věd. Experimentoval s izolovanými buňkami listů schopných a dalšími diferencovanými buňkami z vyšších rostlin. Přestože jeho pokusy byly neúspěšné, vyslovil názor, že pokud mu je známo, tak nebyly dosud provedeny žádné pokusy s izolací buněk. Takový výzkum by mohl přinést významné poznatky o vlastnostech a možnostech, které má buňka jako elementární organismus. Informoval také o vzájemných vztazích a vlivech mezi jednotlivými buňkami v mnohobuněčném celku. Na základě tohoto projevu a jeho experimentů je oprávněně považován za průkopníka rostlinných pletivných kultur (Thorpe 2007).

Objev auxinu a rozpoznání významu vitamínů skupiny B v rostlinách bylo impulsem k dalšímu pokroku v rostlinných kulturách. Pomocí kyseliny indol-3-octová získal Gautheret roku 1939 první kontinuálně rostoucí kulturu z mrkve. S objevem cytokininů a auxinů byla připravena půda pro rychlý rozvoj kultur. To vyvrcholilo roku 1962, kdy Murashige a Skoog připravili v dnešní době nepoužívanější živné medium zvané jako MS medium (Murashige & Skoog 1962).

Dalším významným milníkem byla komerční dostupnost enzymů rozkládající buněčnou stěnu. To vedlo k širokému využití protoplastů v průmyslu v 70. letech 20. století. První demonstraci totipotence protoplastů provedli roku 1971 Takebe a jeho spolupracovníci, kteří vypěstovali rostlinu tabáku z mezofylových buněk. To mělo za následek první mezidruhový hybridní druh (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*) (Bhojwani & Dantu 2013).

3.2.2 Využití *in vitro* pěstování

3.2.2.1 Mikropropagace

Mikropropagace neboli somatická embryogeneze je moderní technika množení rostlin. Somatická embryogeneze se rozděluje na dva typy, a to na přímou a nepřímou. Je definována jako nepohlavní množení rostlin, které je prováděno ve sterilních podmínkách jak materiálu, tak prostředí. Tato metoda je prováděna na definovaném kultivačním mediu v kultivačních nádobách za kontrolovaných světelných, teplotních a vlhkostních podmínek. Jedná se o pěstování izolovaných rostlinných částí (buněk, pletiv, orgánů nebo celých rostlin) na specifických syntetických živných substrátech. Název mikropropagace je doslovný překlad této techniky. Jedná se o preparaci malých částí rostliny, které jsou při tomto způsobu množení rostlin vytvářeny (Máthé et al. 2015). Metoda stojí na jedné vlastnosti rostlinných buněk, totipotenci, která umožňuje dělení jedné dediferencované buňky a vytvořit tak spoustu buněk diferencovaných. Diferencované buňky s určitými vlastnostmi jsou charakteristické pro určité orgány, což vede až k následné regeneraci celého rostlinného těla pod vlivem různých růstových regulátorů růstu (Iliev et al. 2010).

Nepřímá mikropropagace má čtyři základní části. V první fázi se vybírají specifické a aktivně rostoucí orgány nebo explantáty, které se kultivují na přesně definovaném mediu a dojde tak k zahájení pěstování kultury. V druhé fázi explantované buňky reagují na obsah růstových regulátorů (auxinů a cytokininů) a začíná dělení buněk a vývoj orgánů. Ve třetí fázi dochází k prodlužovacímu růstu výhonů vzniklých ze stádia množení a probíhá zakořeňování v *in vitro* podmínkách nebo v *ex vitro* (mimo baňku). Čtvrtá fáze je nejdůležitější, kdy dochází k aklimatizaci rostlin vypěstovaných v *in vitro*. Výsledkem jsou klony mateřské rostliny (Murthy et al. 2023).

Přímá mikropropagace je proces, při kterém se vytvoří somatické embryo na explantátu. To se následně odebere a nechá se uzrát pomocí kyseliny abscisové (ABA). Vytvořená embrya jsou výhodná, protože obsahují kořen i apikální meristém výhonu. Tím odpadá fáze zakořeňování, která nastává při množení pupenů nebo výhonů v *in vitro* podmínkách (Máthé et al. 2015).

3.2.2.2 Ozdravování rostlin od viróz

Proces ozdravování nabízí možnost zbavit rostliny patogenů, a to především virů, bakterií a hub. Pro jejich odstranění lze použít léčebné látky jako fungicidy. Již od 60. let 20. století se tato metoda zabývá kultivací meristémových vrcholů a je nejvíce důležitá u materiálů, které jsou napadeny viry (Smith 2013). Metoda apikálních meristémů se využívá k obnově rostlin infikovaných virem. Tento postup využívá apikální bezvirovou zónu k získání počáteční zdravé rostliny. Apikální meristém je skupina meristemických buněk, které jsou uspořádány do

centra, kde zaujímají svoji pozici a tvoří veškeré orgány a pletiva. Čím je meristém menší, tím je větší pravděpodobnost vypěstování rostliny bez virů. Vysazení meristému probíhá za aseptických podmínek na živné medium, kde je zvýšená koncentrace cytokininů. Pravidelným přesazováním rostlina vyrostne a využije se například k produkci sadbových brambor.

Během kultivace je důležité provádět preventivní testy na přítomnost virových chorob, jako jsou například ELISA testy nebo PCR testy. Když jsou pletiva nakažená je možné použít metody, které jsou schopny viry zlikvidovat, například termoterapii je metoda, která využívá krátkodobé vystavení rostlin vysokým teplotám (37–40 °C). Tím dochází k odstranění virů. Chemoterapie je pak založena na přidání širokospektrálních antivirotik (viazol) do živného media, kde se pěstují rostlinné explantáty (Anikina et al. 2023).

3.2.2.3 Somatická hybridizace

Somatická hybridizace pomocí spojení protoplastů rostlin se stala důležitým krokem ve zlepšování a vytváření nových rostlinných odrůd. Protoplasty jsou získávány pomocí enzymů (celulázy, pektinázy), které štěpí u buněk jejich stěnu. Následně jsou protoplasty spojeny do jedné buňky pomocí chemických látek nebo elektrických impulsů, což umožní fúzi membrán a spojení genetického materiálu. Hybridní buňky jsou následně vloženy na růstové medium, kde probíhá jejich dělení a diferenciaci buněk na nové rostliny. Tato technologie se používá ve šlechtitelství zaměřeném na produkci potomstva s významnými agronomickými vlastnostmi. To umožnilo nejen vnitrodruhovou hybridizaci, ale i tvorbu mezidruhových hybridů a cybridů které vznikají spojením jádra jedné a cytoplazmy druhé buňky. Pomocí této technologie byly do hybridů nebo cybridů úspěšně transferovány různé důležité znaky z donorových rostlin, a bylo umožněno i křížení rostlin stejného pohlaví (Zulkarnain et al. 2015; Grosser et al. 2010).

3.2.2.4 Produkce sekundárních metabolitů

Termín sekundární metabolit je označení pro sloučeninu vyprodukovanou rostlinou, která není nezbytně důležitá pro její růst. Sekundární metabolity jsou často velmi rozmanité a složité molekuly, což z nich činí sloučeniny velmi náročné pro chemicko-syntetickou výrobu, a proto se odvozené biologicky aktivní látky nejčastěji získávají z přirozených zdrojů. Jelikož je většina zdrojů planě rostoucích, obsah důležitých látek bývá nízký. Získávání sekundárních metabolitů je poměrně ekonomicky náročné. Pro tvorbu určitých látek je nezbytně nutné, aby rostlina byla vystavena stresovým podmínkám, které indukují tvorbu požadovaných látek. Kultivace rostlinných pletiv *in vitro* nabízí dobře fungující systém pro produkci přírodních látek. Množení rostlin, kultivace kalusu nebo rostlinných orgánů může poskytnout materiál schopný produkovat sekundární metabolity. Příkladem těchto látek mohou být flavonoidy, chinin a atropin, tyto látky jsou hojně využívány v medicíně (Espinosa-Leal et al. 2018; Wawrosch & Zotechev 2021).

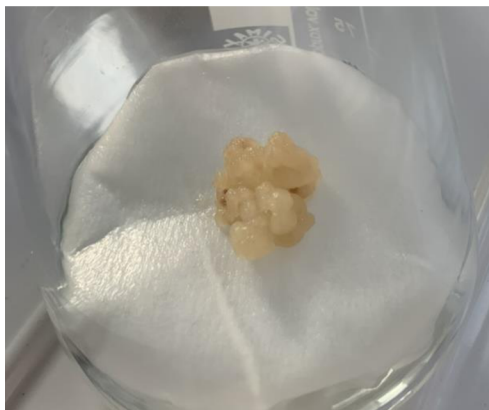
3.2.3 Kalusové kultury

Rostliny vytvářejí neorganizované buňky, jako jsou kalusy nebo nádory, v reakci na různé biotické a abiotické podněty. Jsou to například vliv klimatických podmínek, poranění nebo infekce různými patogeny. První zmínky o tvorbě kalusu pochází již z doby před více než 200

lety, kdy byla tvorba kalusu pozorována u stromů zbavených kůry. Termín “kalus“ pochází z latinského slova *callum*, které znamená tvrdý. V medicíně se pak toto označení používá pro ztluštění kožní tkáně. Z počátku rostlinné biologie se označení kalus používalo jako označení pro masivní růst buněk a hromadění kalózy, které bylo způsobené poraněním. Dnes se slovo kalus používá v širším rozsahu pro označení dediferencované buněčné masy. I z jediné diferencované buňky může vzniknout kalus. Většina buněk, které kalus obsahuje, jsou totipotentní a může z nich vyrůst celé rostlinné tělo. Tato vlastnost je také využívána v genovém inženýrství (Ikeuchy et al. 2013).

K vytvoření kalusových kultur lze použít téměř jakoukoli část těla rostliny. Části odebrané z pletiv se následně kultivují v *in vitro* podmínkách. Živiny jsou dodávány z živného media, které je doplněné růstovými hormony (auxiny a cytokininy). Pravidelným pasážováním lze kultury udržet neomezeně dlouhou dobu. Kalus tvoří buňky, které jsou podobné nediferencovaným meristemickým buňkám. Mají pouze malé vakuoly a nemají chloroplasty pro fotosyntézu (Efferth 2019).

Kalusy jsou velmi rozmanité a lze je rozdělit do několika podskupin na základě jejich makroskopických vlastností. Kalusy bez zjevné regenerace orgánů se obvykle označují jako kalusy kompaktní nebo drobné. Drobné kultury lze využít k vytvoření jednobuněčných (suspenzních) kultur, které se udržují v pozvolně promíchávaném tekutém mediu. Kalusy vykazující stupeň regenerace orgánů se nazývají v závislosti na tom, jaké orgány indukují. Jsou to kořenové, výhonkové nebo embryonální kalusy. Zásadní roli v tom, jaký kalus se bude tvořit, hraje poměr auxinů a cytokininů. Je také důležité, jaké konkrétní látky z těchto fytohormonů použijeme. Při stejném zastoupení v živném mediu se tvoří kalus kompaktní nebo drobný. Při vyšší koncentraci auxinů se vytváří kalus kořenový, a naopak při vyšší koncentraci cytokininů se indukuje kalus výhonkový (Ikeuchy et al. 2013; Ribeiro et al. 2021).



Obr. 3: Kalusová kultura (Zdroj: Autor práce)

3.3 Fytohormony

Termín hormon pochází z řeckého slova “*horman*“, které znamená stimulovat. Tento termín byl poprvé použit roku 1905 Starlingem. V průběhu 20. století byla u rostlinných druhů objevena řada sloučenin, které se u nich přirozeně vyskytují. Tyto nízkomolekulární látky s fyziologickou aktivitou byly označeny jako fytohormony. Působí ve velmi nízkých koncentracích a projevují svůj účinek na dálku, kdy regulují veškeré vývojové a fyziologické

procesy po celou dobu rostlinného života. Mezi tyto látky patří například auxiny, cytokininy, gibbereliny, ABA, ethylen a další (Mukherjee et al. 2022; Piotrowska & Bajguz 2011).

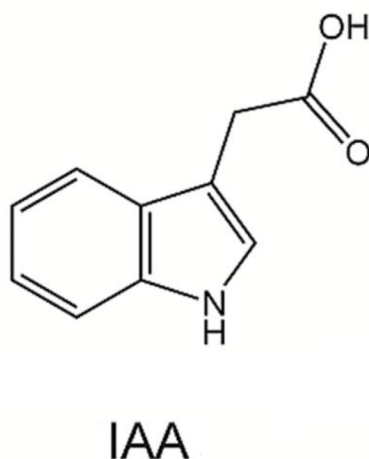
Abychom přiměli rostliny k tvorbě kalusu, je důležité, aby byly vysazeny do vhodného živného media. Důležitý je také obsah růstových regulátorů. Těmi jsou sloučeniny, které při kultivaci rostlinných pletiv zajišťují růst vysazeného pletiva nebo orgánu.

Auxiny jsou důležité při vývoji a udržování kalusu. Významně se také podílejí na prodlužování buněk. Cytokiny jsou významné pro svou roli při kultivaci rostlinných pletiv. Na rozdíl od auxinů jsou významnými mediátory podporující dělení rostlinných buněk a jejich následného růstu. Gibbereliny stimuluje růst rostliny do výšky, prodlužováním internodií (Baday 2018).

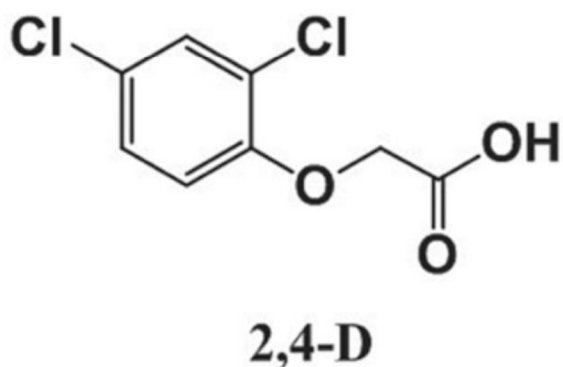
Mezi inhibitory růstu se řadí etylen a kyselinu abscisová (ABA). Tyto látky se pohybují v opačném směru a mají především zpomalovat nebo zastavovat růst rostlin. Tyto látky se syntetizují především tehdy, když jsou rostliny vystaveny různým stresovým situacím. Příkladem může být sucho nebo zasolení půdy (Rowe et al. 2016)

3.3.1 Auxiny

Auxiny patří do skupiny fytohormonů, které podporují růst rostlin. Jsou produkovány v nadzemní části rostlin v meristematických pletivech, především ve vrcholových pupenech, listech a květech. Hlavním prekurozorem biosyntézy je aromatická aminokyselina tryptofan, která je produkována v chloroplastech. Auxiny jsou transportovány směrem dolů, bazipetálně, pomocí floému. Hlavním přirozeným auxinem v rostlinách je kyselina indol-3-octová (IAA; Obr. 4), ale bylo prokázáno, že mnoho látek má shodné účinky jako tento hormon. Příkladem jsou kyseliny 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D; Obr. 5), naftyloctová (NAA) a picloram. Auxiny hrají pro rostliny důležitou roli při růstu a větvení, ve vývojovém procesu mají úlohu iniciace tvorby postranních orgánů a podporují větvení kořene (Sezgin & Kahya 2018).



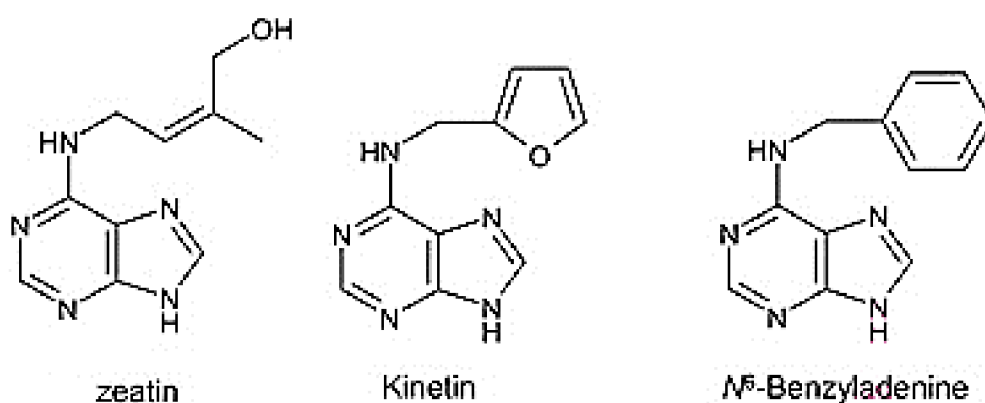
Obr. 4: Strukturální vzorec IAA (převzato od Frick & Stander 2018)



Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny 2,4-D (převzato od Busi et al. 2018)

3.3.2 Cytokininy

Cytokininy jsou deriváty adeninu, které podporují dělení buněk a zpomalují jejich stárnutí. Mezi tyto rostlinné hormony vyskytující se přirozeně v rostlinách patří kinetin, zeatin a 6-benzylaminopurin (BAP; Obr. 6). Dříve se předpokládalo, že cytokininy se syntetizují v kořenech a následně jsou xylémem transportovány do celé zelené části rostliny. Novější studie však naznačují, že se cytokininy tvoří v celé rostlině, ale nejvíce se jich vyprodukuje v meristémeh kořenů (Osugi & Sakakibara 2015). Auxiny podporují tvorbu kořenů, zatímco cytokininy mají odlišný efekt a podílejí se také skoro na všech aspektech vývoje rostliny. Stimulují tvorbu postranních výhonů, zatímco inhibují tvorbu terminálních výhonů. Cytokininy jsou také významné pro podporu tvorby a vývoje rostlinných orgánů v *in vitro* kulturách (Kieber & Schaller 2014).



Obr. 6: Strukturní vzorce cytokininů (převzato od Jameson 2023)

3.3.3 Gibereliny

Gibereliny jsou diterpenové rostlinné hormony, které mají klíčový vliv na růst a vývoj rostlin jako auxiny. Tyto látky byly poprvé objeveny v souvislosti s chorobami rostlin v roce 1926 japonským vědcem Kurosawou, který pozoroval, že rostliny rýže abnormálně přerůstaly díky působení vřeckovýtrusné houby *Gibberella fujikuroi* Saw. Zodpovědná látka byla

následně izolována a pojmenována jako kyselina gibberelová (GA_3). Kyselina má stimulační účinky na prodloužení internodií a rozkvět rostlin. Tyto látky jsou nejčastěji syntetizovány v apikálních pupenech a listech. V praxi se GA_3 používá ke zmenšení počtu plodů, což vede ke zvětšení jejich hmotnosti. Významně také podporuje klíčení semen (Takahashi et al. 2012).

3.3.4 Strigolaktony

Strigolaktony představují novou třídu fytohormonů, které souvisejí s větvením rostlin. Spolu s auxiny byly v minulém století považovány za dva nejdůležitější hormony při vzniku apikální dominance. Tyto rostlinné hormony jsou produkovány v kořenech a pomocí xylému jsou akropetálně transportovány do horních částí rostliny. Jsou také důležité v navazování symbiózy s mykorrhizními houbami, kdy jsou uvolňovány do půdy, aby symbionty nalákaly ke kořenům rostlin, kterým jsou tak lépe přístupné živiny a voda. Nejvýznamnější látkou z této skupiny je strigol (Zwanenbur et al. 2016).

3.3.5 Kyselina abscisová

Kromě přírodních látek, které podporují růst, se i v rostlinách nacházejí látky inhibiční. Nejvýznamnější z nich je kyselina abscisová (ABA). Nejvíce se vyskytuje v zelených částech rostliny. Výrazné množství této kyseliny se nachází ve spících pupenech a semenech, u kterých způsobuje dormanci. K produkci těchto látek dochází v cytoplazmě mezofylových buněk (Sezgin & Kahya 2018).

Podle Hartunga et al. (2002) ABA také patří mezi hormonální signály stresu. Jakmile dochází v okolí kořenů k nedostatku vody, je ABA uvolňována do xylému, kde je transpiračním proudem vedena do nadzemní části. Zde dochází ke zpomalení růstu listů a uzavírání průduchů, aby se zamezilo transpiračním ztrátám vody. Na konci vegetačního období kyselina urychluje opad listů.

Yang et al. (2006) konstatuje, že některé pokusy naznačují, že zvýšená koncentrace ABA je nezbytná k tomu, aby se zabránilo nadměrné syntéze ethylenu při vodním stresu a následnému předčasnému dozrání. Důsledkem této interakce může ABA fungovat spíše k udržení než potlačení vhodného růstu rostlin.

3.3.6 Ethylen

Ethylen je jednoduchý plynný uhlovodík obsahující dva atomy uhlíku spojených dvojnou vazbou. Patří do skupiny inhibitorů růstu, kdy je nejčastěji spojován s dozráváním plodů. Hraje ovšem důležitou roli po celou dobu života rostliny. Většina pletiv je schopna ethylen syntetizovat, jeho obsah v rostlině je však poměrně nízký. Koncentrace ethylenu se zvyšuje především během událostí vývoje jako je klíčení semen a kvetení. Produkce ethylenu je vyšší v období stresových podmínek pro rostlinu. Inhibuje rovněž růst nadzemní části a stimuluje růst kořenů. Pomáhá tak přežít rostlině nepříznivé podmínky (Schaller & Kieber 2002).

3.3.7 Brassinostreoidy

Brassinostreoidy (BR) jsou také látky patřící do skupiny rostlinných hormonů. Jsou to deriváty sterolů, a poprvé byly popsány v pylu řepky (*Brassica napus* L.). Od této rostliny

pochází i jejich název. Strukturálně jsou pak velmi podobné živočišným steroidním hormonům (Oklestková et al. 2015). BR se nacházejí ve všech částech rostlinného těla, kde mají různé role v růstu a vývoji rostlin. Regulují dělení, prodlužování a diferenciaci různých typů buněk. Mají pozitivní vliv na toleranci rostliny k různým biotickým a abiotickým stresům (sucho, chlad, zasolení). Pokusy ukazují, že brassinostreoidy se podílejí i na aklimatizaci na environmentální stresy, rezistenci vůči patogenům a prodlužování buněk. Výsledkem je zvýšení růstu a výnosu plodin (Manghwar et al. 2022).

3.4 Stres

Stres u rostlin vzniká působením vnějších podmínek, které jsou nepříznivé pro rostlinu a ovlivňují její růst a vývoj., a lze ho rozdělit do dvou základních skupin. Podle toho, zda je stres způsoben živým nebo neživým činitelem, se rozdělují stresy na biotické a abiotické. Abiotický stres působí na rostliny prostřednictvím fyzikálních nebo chemických faktorů, zatímco u biotického stresu je rostlina vystavena biologické složce. Některé stresy poškozují rostlinu takovým způsobem, že vykazuje řadu metabolických dysfunkcí. Pokud je stres mírný nebo působí krátkodobě, rostlina se z něj dokáže zotavit. Pakliže je stres silný a působí po delší dobu, dochází k odumírání rostliny.

Biotickými stresy jsou například viry, bakterie, hmyz nebo působení jiných rostlin. Připravují rostlinu o důležité živiny, což může vést až k úhynu rostliny. Mnoho biotických stresorů ovlivňuje fotosyntézu, kdy povrch listové plochy buď zmenšují (žravý hmyz) nebo zastiňují (plevelé) (Gull et al. 2019).

3.4.1 Abiotický stres

Do skupiny abiotických stresů se řadí vnější vlivy prostředí. Za abiotický stres se považuje jakýkoliv faktor, který nepříznivě ovlivňuje růst rostliny a není způsoben živým organismem. Třemi hlavními abiotickými stresory jsou teplota, zasolení a sucho, respektive nedostatek vody v půdním profilu. Velký podíl má na tom také antropogenní činnost – odběr podzemní vody, nadměrné hnojení.

Teplotní stres se rozděluje na dva druhy. Pokud teplota prostředí přesáhne optimální teplotu pro růst dané rostliny, hovoříme o tepelném stresu. Mezi regulační faktory teplotního stresu patří doba a intenzita, po kterou je rostlina vytavena světelné radiaci. Jestliže teplota klesne pod optimální teplotu, pak hovoříme o chladovém/mrazovém stresu. Rostliny se adaptují na nízkou teplotu sadou různých mechanismů (koncentrace cukrů).

Stres, způsobený nedostatkem vody po delší dobu, se označuje jako sucho. To je nejčastěji způsobeno nízkým úhrnem srážek a nedostatkem vody v půdním profilu (Bera et al. 2022).

3.4.2 Stres ze zasolení

Zasolení půdy je jedním z nejvýznamnějších globálních problémů, který negativně ovlivňuje produktivitu plodin zemědělských systémů po celém světě. Zasolení má záporný dopad na fyziologické a biochemické fungování rostliny, kdy narušuje růst a vývoj rostlin v důsledku nedostatku vody a cytotoxicity, která je spojena s nadměrným příjmem iontů sodíku

(Na⁺) a chloru (Cl⁻). Sodík rostlina ukládá do vakuol, aby nezpůsobil toxicitu v cytosolu buněk, kde je důležitý dostatek draslíku, který je potřebný pro enzymatické reakce. Sodík vytěšňuje draslík, což působí rostlině značné problémy. Chlor se pak akumuluje ve výhoncích (Isayenkov 2012).

Ionty také vytváří fyziologické sucho snížením osmotického potenciálu vody obsaženého v půdě, a tak dochází k nedostatku přijímání živin rostlinou. Ukládání sodného kationtu ve velké míře způsobuje zkracování životaschopnosti listů a tvoří se nekrózy. Zasolení obvykle bývá doprovázeno oxidačním stresem, který je způsoben tvorbou reaktivních forem kyslíku (Bera et al. 2022)

Reakce rostliny na zvýšenou přítomnost NaCl jsou rozděleny do dvou hlavních fází. V první fázi dochází ke snížení růstu, k němuž dochází během několika minut až dnů. Dojde k uzavření průduchů a inhibici růstu buněk. Druhá fáze následuje poté a probíhá několik dnů až týdnů. Nahromaděné cytotoxické ionty zpomalují metabolické procesy, a může dojít i k následujícímu úhynu buněk, pletiv, orgánů, až nakonec celé rostliny (Isayenkov & Maatus 2019).

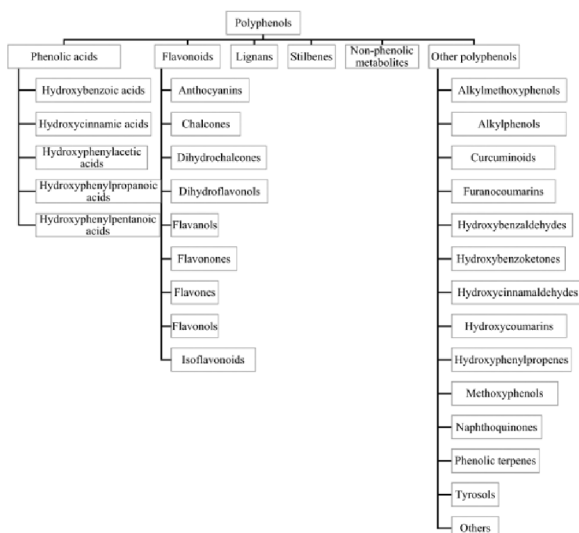
3.4.3 Osmotický stres

Osmotický stres nastává v rostlině v důsledku zasolení substrátu a následnému nedostatku volné vody v okolí, tedy tento jev nastává v hypertonickém prostředí. Opakem je hypotonie, kdy v okolním prostředí je méně rozpuštěných látek a voda je osmotickým tlakem hnána dovnitř buněk. Po vystavení osmotickému stresu vykazují rostliny širokou škálu reakcí jak na buněčné, tak i na úrovni celé a rostliny. To zapříčiní, že rostlina není schopna přijímat vodu a s ní i minerální látky, jako je například draslík nebo vápník (Gull et al 2019).

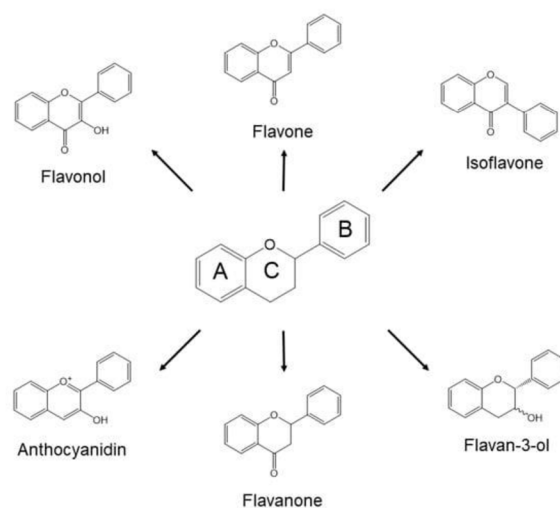
V reakci na sucho a zasolení je rostlina nucena produkovat látky (osmolyty), které jí usnadní příjem vody. Příkladem takové látky je aminokyselina prolin, který je významným zdrojem uhlíku a dusíku. Prolin není důležitý pouze pro vyrovnání osmotického tlaku., kdys se hromadí se ve vakuolách a cytosolu buňky. Bylo prokázáno, že chrání také před nežádoucím působením reaktivních forem kyslíku. Dále je schopen chránit proteiny, DNA a membrány před těmito látkami. Osmotický stres, který je vyvolaný nedostatkem vody, snižuje syntézu bílkovin, účinek fotosyntézy, akumulaci živin a zvyšuje oxidační metabolismus v rostlinných buňkách (Upadhyaya et al. 2013).

3.5 Rostlinné polyfenoly

Přírodní polyfenoly jsou skupinou sloučenin s širokou škálou komplexních struktur, které rostliny přirozeně vytvářejí jakožto sekundární metabolity. Základním stavebním kamenem polyfenolů je fenolový kruh. V závislosti na seskupení fenolového kruhu je lze klasifikovat do mnoha tříd (Obr. 7). Hlavními třídami jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, fenolové alkoholy a lignany. Tyto látky jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi, což znamená, že pomáhají chránit buňky před poškozením volnými radikály a oxidačním stresem. Tato vlastnost snižuje pravděpodobnost vzniku poškození i chorob. Polyfenoly jsou tedy látky, které jsou důležité nejen pro rostliny, ale jsou také důležitou složkou lidské potravy, která pomáhá předejít různým závažným onemocněním (Abbas et al. 2017; Ammar et al. 2023).



Obr. 7: Klasifikace polyfenolů (Ammar et al. 2023)



Obr. 8: Strukturální vzorce flavonoidů (Kawabata et al. 2019)

3.5.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou strukturou rozmanité nízkomolekulární sekundární metabolické látky. Jsou syntetizované v cytosolu buňky řadou enzymatických reakcí z fenylalaninu a malonyl-koenzymu A a následně jsou transportovány do buněčných vakuol. Všechny flavonoidy jsou strukturálně odvozeny od základní látky – flavonu. V přírodě bylo identifikováno více než 6 500 různých flavonoidů. Jsou to důležité látky, které chrání rostlinu před biotickými stresory, zejména mikroby a hmyzem. Dále pomáhají chránit před mrazem a suchem. Mají schopnost absorbovat UV záření a slouží jako ochranný mechanismus proti němu. Mají důležitou roli v semenech, kde napomáhají klíčení a růstu malých semenáčků (Samanta et al. 2011).

Syntéza flavonoidů probíhá ve všech částech rostliny a tyto látky vykazují vysokou antioxidační schopnost. Každá rostlinná část produkuje různé druhy dle aktuální potřeby a využití. Flavonoidy jsou nejvíce důležité u generativních orgánů, zejména u květů způsobují pigmentaci okvětních lístků. Tyto barvy slouží jako signál pro hmyz, aby se přiblížil a provedl opylení květů. Následně se pak díky podskupině antokyanů zbarvují i plody, a tyto metabolity jsou také důležité pro vůni a chuť (Dias et al. 2021).

Flavonoidy jsou deriváty fenolových kyselin s poměrně složitou strukturou. Jsou uspořádány 15 atomy uhlíku, obsahují dva benzenové kruhy (A a B) a heterocyklický kruh (C). Dělí se na flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, antokyanidiny a flavanoly (Mustafa et al. 2020; Obr. 8).

4 Metodika

Experimentální část bakalářské práce se skládala z několika dílčích kroků, kdy prvním bylo odvození kalusové kultury z hypokotylu pšenice seté odrůdy 'Bohemia'. Následně bylo ověřováno, jaká koncentrace různých regulátorů růstu nebo jejich kombinace bude mít pozitivní vliv na růst kalusů. V poslední části byl testován vliv stoupající koncentrace soli v mediu na připravené kultury a na celkový obsah flavonoidů. Pokus byl prováděn v laboratořích Katedry botaniky a fyziologie rostlin na České zemědělské univerzitě v Praze. Pokus začal v březnu 2023 a byl ukončen na konci března roku 2024.

4.1 Rostlinný materiál

Osivo pro tento pokus bylo poskytnuto Výzkumnou stanicí Uhřetěves, která patří pod Českou zemědělskou univerzitu v Praze. Odrůda pšenice seté 'Bohemia' byla roku 2007 registrována v České republice a následující rok prošla i zkouškami, které byly prováděny na Slovensku. Udržovatelem odrůdy je osevařská společnost SELGEN, a.s., kde byla i vyšlechtěna, a to konkrétně ve Šlechtitelské stanici Úhřetice. Jedná se o křížence linií s rodokmenem (540i × U6192) × (540i × Kontrast), které pocházejí také z této šlechtitelské stanice.

Odrůda je vhodná do většiny výrobních oblastí, nejlepších výnosových ukazatelů dosahuje především v kukuřičné, obilnářské a řepařské výrobní oblasti. Jedná se o poloranou odrůdu, která se dle hodnocení pekárenské jakosti nachází v jakostní skupině A, kvalitní pšenice. Má vysokou mrazuvzdornost a dobrou odolnost proti chorobám pšenice. I přes svůj celkem vysoký vzrůst je poměrně odolná proti poléhání.

Hmotnost tisíce semen se pohybuje v rozmezí od 50 do 55 gramů a objemová hmotnost je okolo 820 gramů. Obsah dusíkatých látek je obvykle 13,5 procent. Optimální výsevek jsou 3–4 miliony klíčících semen (SELGEN, a. s. 2010).

4.2 Laboratorní pomůcky, kapaliny, přístroje

Laboratorní pomůcky

- Erlenmeyerovy baňky
- Laboratorní sklo (kádinky, nálevky, zkumavky, odměrky, odměrné baňky, Petriho misky)
- Hliníková folie
- Filtrační papír o průměru 9 cm (tvorba můstků)
- Pinzeta
- Skalpel
- Sítko
- Pipeta
- Váženky a lžičky
- Rouška a rukavice

Chemikálie

- Živné medium MS (Murashige & Skoog 1962)
- Savo
- Ethanol – 96% p.a.; technický
- Methanol
- Ultračistá voda
- 2,4-D
- BAP
- Kinetin
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Chlorid hlinitý (AlCl₃)
- Dusitan sodný (NaNO₂)

Přístroje

- Flowbox
- Pěstební komora
- Spektrofotometr
- Sušárna
- Analytické váhy
- Autokláv
- Ultrazvuková lázeň
- Počítač
- Mobilní telefon (fotografování pokusu)

4.3 Živné medium

Pro tento pokus bylo použito MS medium, které bylo představeno roku 1962 japonským fyziologem rostlin Toshio Murashigem a americkým fyziologem Folke Skoogem. Medium bylo původně určeno pro pokusy na tabáku a postupem času se ukázalo, že je poměrně univerzální. V současné době je jedním z nejpoužívanějších živných medií pro *in vitro* pěstování.

Všechny uvedené látky (Příloha 1) byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky (1 l) a následně rozpuštěny v ultračisté vodě, pH media bylo upraveno na 5,8. Hotové medium bylo rozplněno do Erlenmeyerových baněk s papírovým můstkem po 25 ml. Baňky byly uzavřeny dvojitou hliníkovou folií a následně umístěny do autoklávu, kde probíhala jejich sterilizace při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a tlaku 15 psi. Sterilizace probíhala vlhkým teplým vzduchem za zvýšeného tlaku. Pro použití bylo nezbytné nechat media vychladnout.

4.4 Provedení pokusu

Semena pšenice seté byla nejprve vydezinfikována pomocí naředěného (1%) přípravku Savo s účinnou látkou chlornanem sodným (NaClO) po dobu 15 minut. Následně byla třikrát promyta destilovanou vodou a umístěna na živné medium v Erlenmeyerových baňkách doplněné pro zpevnění o 8 g agaru. Toto medium bylo připraveno pouze pro klíčení rostlin.

Klíčení probíhalo v *in vitro* podmínkách při teplotě 25 °C po dobu jednoho týdne v pěstebním boxu. Pasážování probíhalo ve flowboxu a byly používány jednorázové rukavice, rouška a sterilní nástroje, aby byla omezena možná kontaminace vzorků.

Z celkového množství 100 semen, vyklíčilo pouze 60. Z vyklíčených rostlin byly pomocí skalpelu vypreparovány hypokotyly, které byly případně rozděleny na kratší části. Ty byly následně umístěny na papírové můstky do Erlenmeyerových baněk do MS media s koncentrací 2,4-D 4 mg/l pro indukci tvorby kalusu. Z počtu 77 hypokotylů byl indukován kalus u 27 % z nich (Obr. 9). Koncentrace 2,4-D byla zvolena na základě práce Rahman et al. (2008) jako nejúčinnější u jimi sledovaných odrůd, vypreparované části rostliny byly rovněž udržovány ve tmě. Během 14 dnů se na koncích připravených explantátů začaly postupně tvořit kalusy, které byly následně třetí týden od separace hypokotylů přesazeny na čerstvé MS medium s 4 mg/l 2,4-D. Kultury byly následně každé tři týdny pravidelně pasážovány, aby byl získán dostatečný počet kalusů pro další práci (Příloha 2 obr. 10).

Pro optimalizaci koncentrace použitého auxinu, případně doplnění media o další růstové regulátory, byla nejprve využita studie Ashraf et al. (2022), kdy byla připravena media o různých koncentracích kyseliny 2,4-D (4; 6; 8; 10 mg/l). Kalusy z pasáže 11 (Obr. 11-14) byly do baněk s těmito medii přesazeny a kultury byly inkubovány opět tři týdny za předchozích podmínek (tma, 25 °C). Pro každou variantu byla připravena čtyři opakování. Během pasážování byla vážena čerstvá hmotnost (fresh weight; FW0) přesazovaného kalusu, následně i jeho hmotnost na konci (FW1) a po vysušení (dry weight; DW) při 40 °C po dobu 48 h pro výpočet hmotnostního přírůstku a stanovení sušiny, respektive obsahu vody.

Na základě výsledků (Kap. 5, Graf 1 a 2) byla pro další pokusy zvolena koncentrace auxinu s 8 mg/l. V další pasáži (12) byl testován vliv cytokininů dle Rashid et al. (2002), kdy byly do media přidány BAP nebo kinetin o koncentracích 0,1; 0,5 a 1,0 mg/l. Kalusy pěstované v mediu pouze s 2,4-D byly brány jako kontrolní, u každé varianty byla opět čtyři opakování. Nejvyšší hmotnostní přírůstek zaznamenala varianta BAP 1,0 mg/l a kalusy byly dále pasážovány na media s tímto regulátorem o dané koncentraci.

Na závěr (pasáž 14) byla zkoumána reakce kalusu pšenice seté 'Bohemia' na stresové podmínky, konkrétně zasolení, kdy koncentrace NaCl v roztoku byla 50, 100 a 200 mmol/l (mM). Kalusy pěstované na mediu bez soli byly použity jako kontrolní. Pro všechny koncentrace byla připravena čtyři opakování. Kalusy byly v rámci pasážování a následně po třech týdnech opět zváženy (Obr. 15-18).

Pro stanovení celkového množství flavonoidů byla použita metoda dle práce Tsanova-Savova et al. (2018). Po vysušení kalusů byly vzorky rozdrobeny v třecí misce a extrahovány v 80 % methanolu (MeOH). Extrakce byla prováděna na dvakrát, kdy ke vzorku ve zkumavce bylo vždy přidáno 2,5 ml MeOH. Zkumavky byly umístěny do ultrazvukové lázně při 35 kHz, 50 °C po dobu 15 minut, a poté byl extrakt přefiltrován přes mikrofiltr. Do zkumavky bylo opět přidáno rozpouštědlo a extrakce byla zopakována za stejných podmínek. Získané filtráty byly spojeny a případně doplněny na 5 ml 80 % MeOH.

Pro spektrofotometrické stanovení flavonoidů bylo smícháno 200 µl extraktu, 760 µl ultračisté vody a po protřepání přidáno 120 µl 5 % NaNO₂, 120 µl 10 % AlCl₃ a 800 µl 1M NaOH. Vzniklá směs byla proměřena na spektrofotometru proti slepému vzorku při vlnové délce 415 nm a celkový obsah flavonoidů byl vypočten jako ekvivalent kvercetinu (QE) použitého pro vytvoření kalibrační křivky v mg/g DW.

4.5 Vyhodnocení výsledku

Výsledky byly vyhodnocovány v programu MS Excel, kde byly počítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze čtyř variant u konkrétní koncentrace fytohormonů a chloridu sodného. Přírůstek po třech týdnech byl hodnocen pomocí growth indexu (GI; Nawara et al. 2017).

$$GI = \frac{FW1 - FW0}{FW0} * 100$$

FW1...hmotnost 21. den; FW0...hmotnost 0. den

Relative water content (RWC) – relativní obsah vody, jaké procento hmotnosti zaujímá voda v kalusu

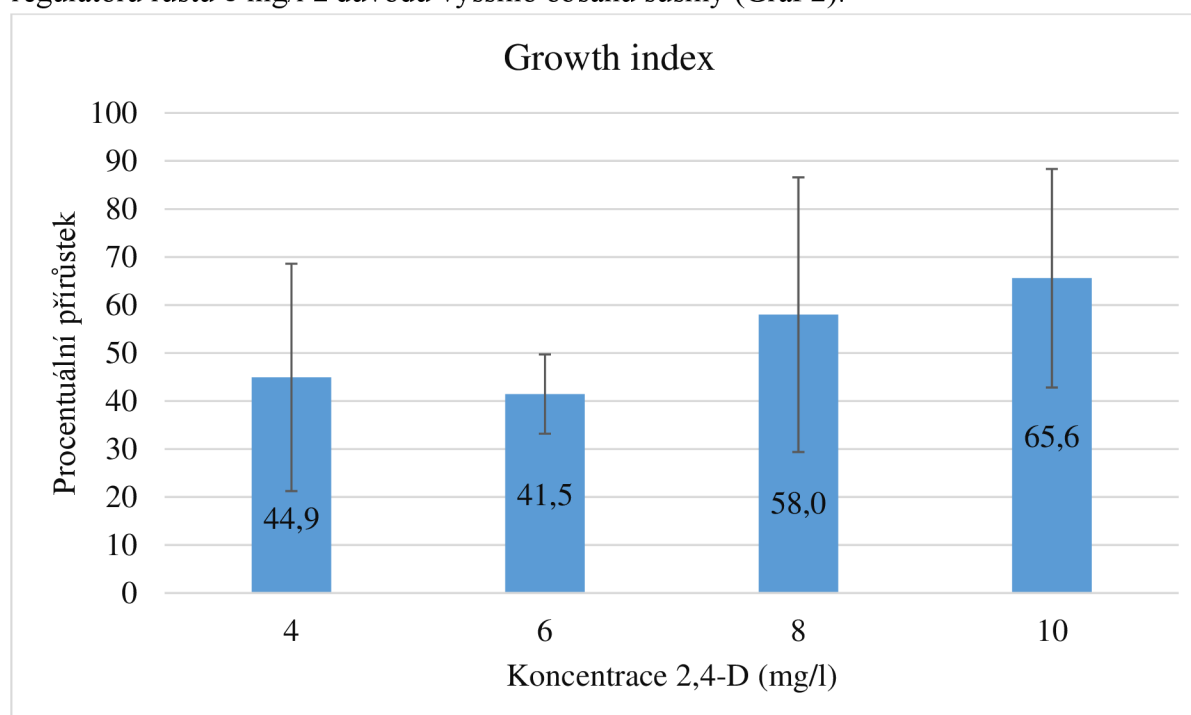
$$RWC = \frac{FW1 - DW}{FW1} * 100$$

DW...hmotnost sušiny

5 Výsledky

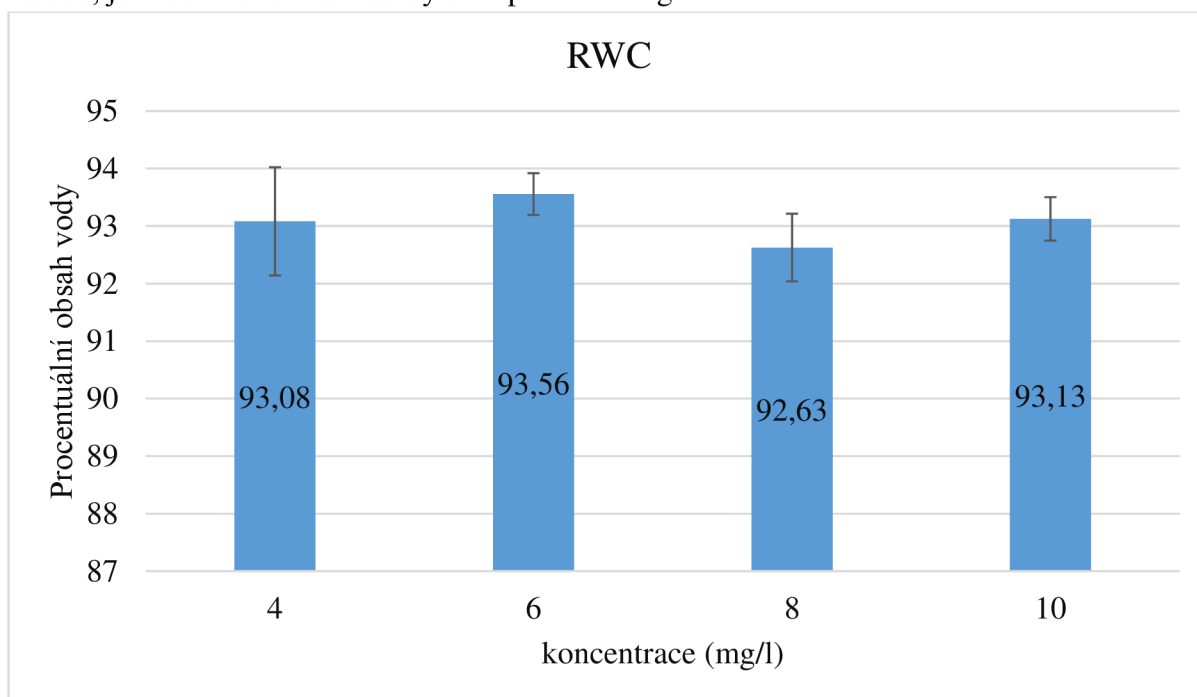
5.1 Vliv kyseliny 2,4-D na růst kalusu

Na grafu 1 lze vidět procentuální přírůstek (GI) po 21 dnech u jednotlivých variant, které obsahovaly různé koncentrace 2,4-D v jednom litru MS media. Se stoupající koncentrací použitého regulátoru růstu 2,4-D byl pozorován i postupný nárůst procentuálního přírůstku čerstvé hmotnosti kalusu. Výjimku představovaly vzorky, kde byla aplikována koncentrace 6 mg/l, nicméně vzhledem k odchylce u naměřených hodnot, nelze tento pokles považovat za signifikantní. Pro další část pokusu pak bylo zvoleno množství 2,4-D jako základního regulátoru růstu 8 mg/l z důvodu vyššího obsahu sušiny (Graf 2).



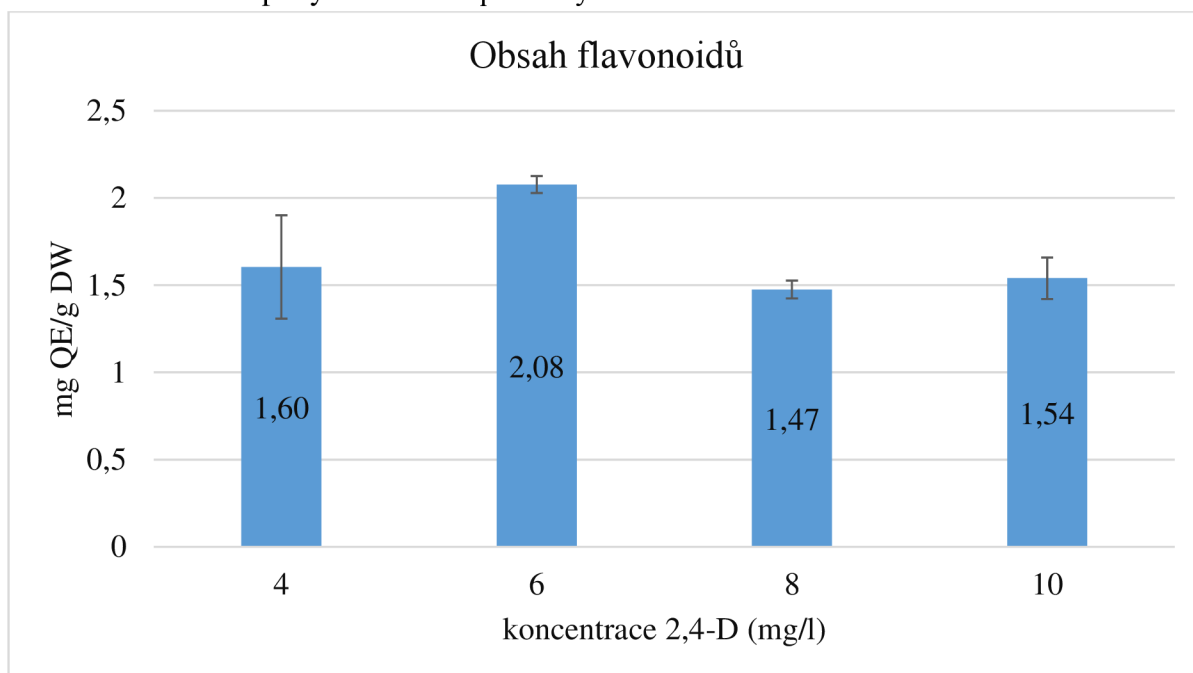
Graf 1: Vliv regulátoru růstu 2,4-D na growth index kalusu.

Graf 2 ukazuje relativní obsah vody u jednotlivých vzorků s různými koncentracemi použitého 2,4-D. RWC se u všech sledovaných variant pokusu pohyboval okolo hodnoty 93 %. Přestože pozorujeme, že rozdílné koncentrace kyseliny 2,4-D neměly výrazný vliv na RWC kalusů, je vidět menší hodnota byla u aplikace 8 mg/l.



Graf 2: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci 2,4-D v mediu.

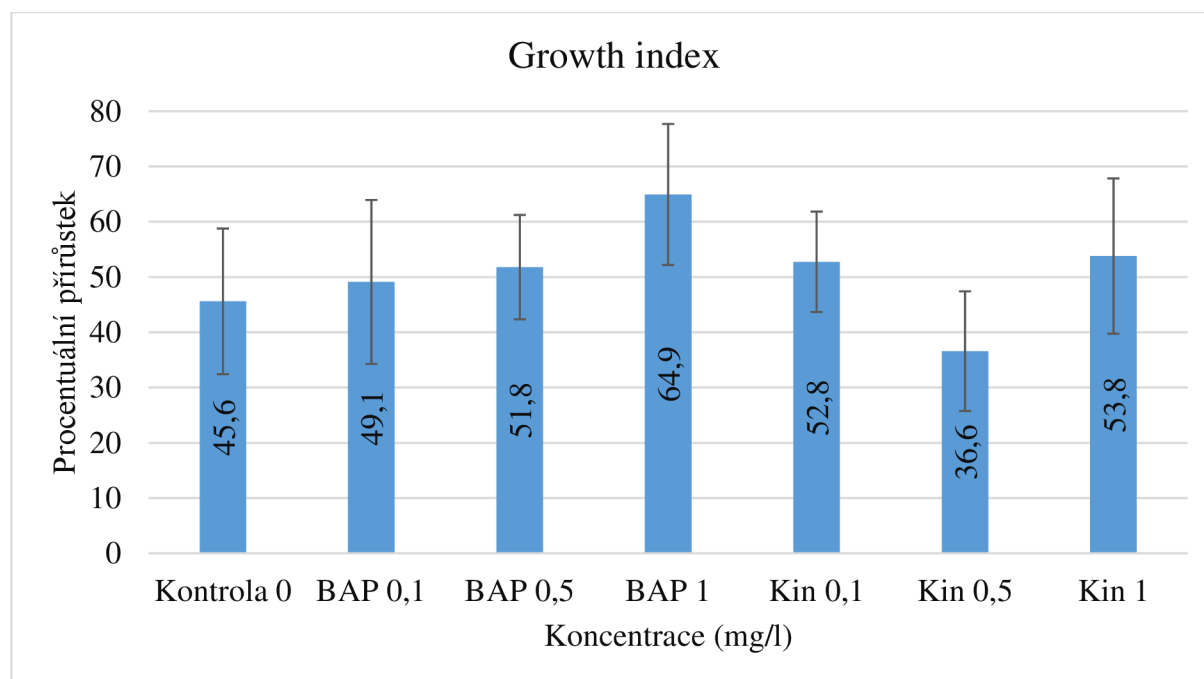
Graf 3 uvádí obsah flavonoidů v kalusech odrůdy Bohemia, kdy největší nárůst koncentrace této skupiny sekundárních metabolitů byl zaznamenán u vzorků, kde živné medium obsahovalo 6 mg/l regulátoru 2,4-D. U ostatních variant bylo naměřené množství flavonoidů menší a pohybovalo se v podobných hodnotách.



Graf 3: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci 2,4-D v mediu.

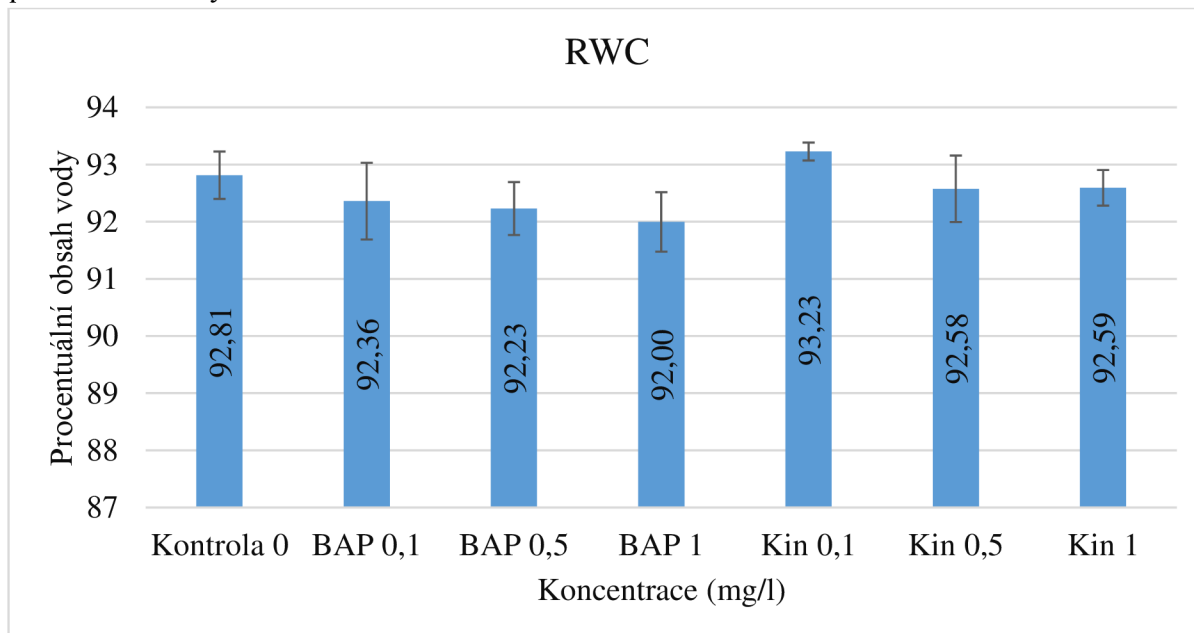
5.2 Vliv cytokininu na růst kalusu

Vliv cytokininů na procentuální přírůstek hmoty kalusu po 21 dnech kultivace je zobrazen v rámci grafu 4. Kontrolní medium tohoto pokusu bylo připraveno s 8 mg/l auxinu 2,4-D, u ostatních variant živný roztok obsahoval jeden z regulátorů růstu (BAP, kinetin – Kin) ve třech koncentracích (0,1; 0,5 a 1 mg/l.). S přibývajícím množstvím jednotlivých regulátorů růstu byl zaznamenán postupný nárůst GI kalusu. Odchylku od trendu vykazovala varianta s 0,5 mg/l kinetinu, která byla pod úrovní kontrolní varianty (Příloha 2 obr. 11–14).



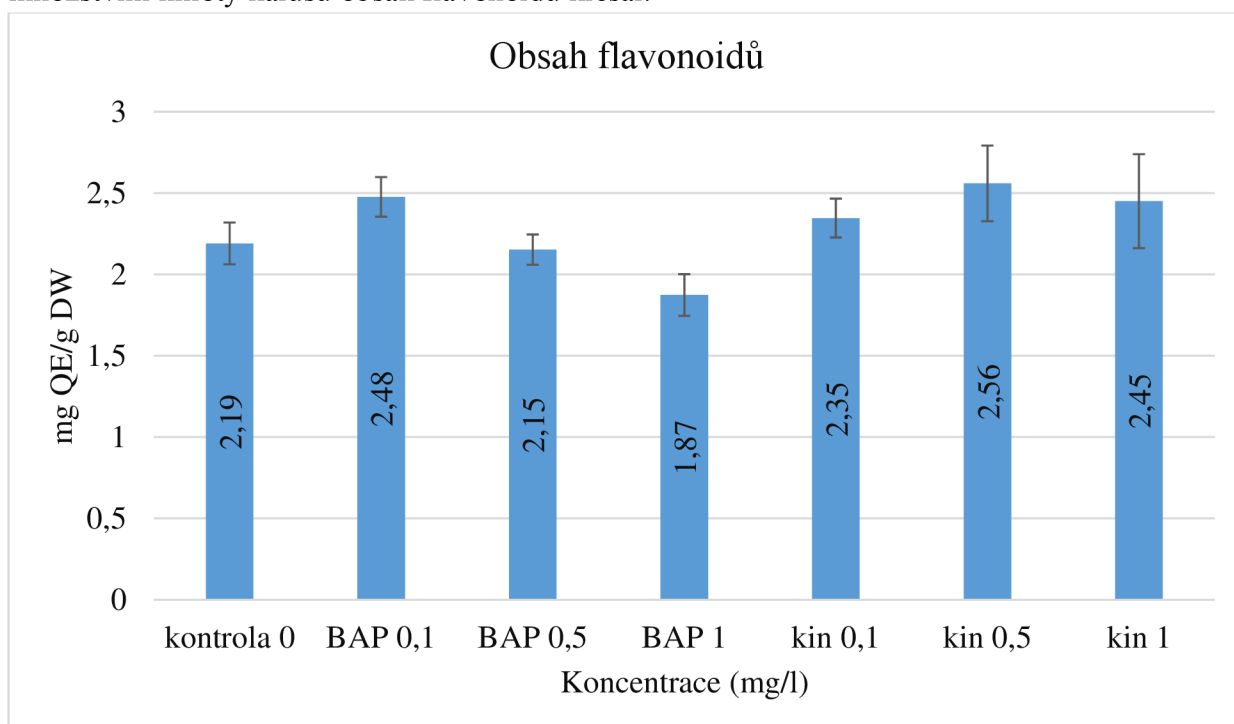
Graf 4: Vliv cytokininů na growth index kalusu.

Graf 5 znázorňuje procentuální zastoupení vody v kalusové kultuře. Se zvyšujícím se obsahem cytokininů zároveň klesal relativní obsah vody. Vzorke, které obsahovaly 0,1 mg/l kinetinu, se jako jediné dostaly přes hranici 93 % podílu vody. Naopak nejnižší obsah vody byl v kalusu u varianty, která obsahovala 1 mg/l BAP. Tato varianta také zaznamenala nejvyšší přírůstek GI a byla následně zvolena k další kultivaci.



Graf 5: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci cytokininů v mediu.

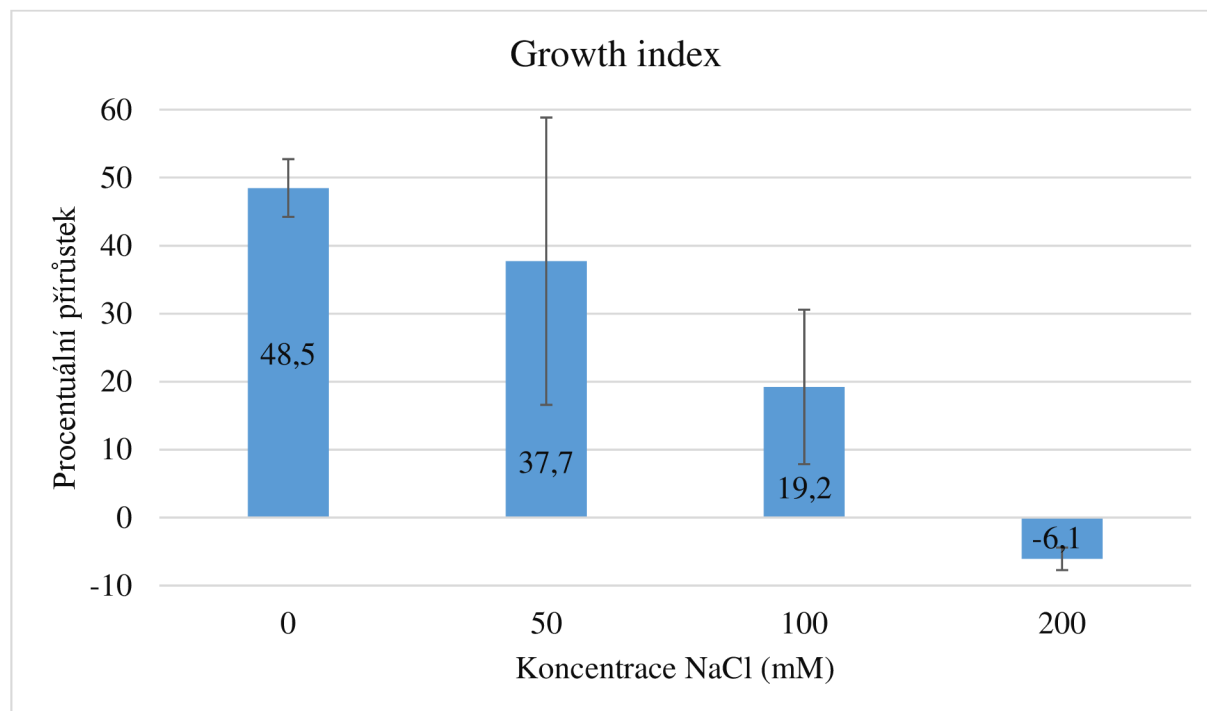
Na grafu 6 lze vidět obsah flavonoidů v *in vitro* kultuře pšenice po aplikaci cytokininů. U BAP s narůstající koncentrací klesalo množství flavonoidů, zatímco u kinetinu byl pozorován spíše vzestupný trend. Při srovnání s grafem 4 je tak vidět, že s přibývajícím množstvím hmoty kalusu obsah flavonoidů klesal.



Graf 6: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci cytokininů v mediu.

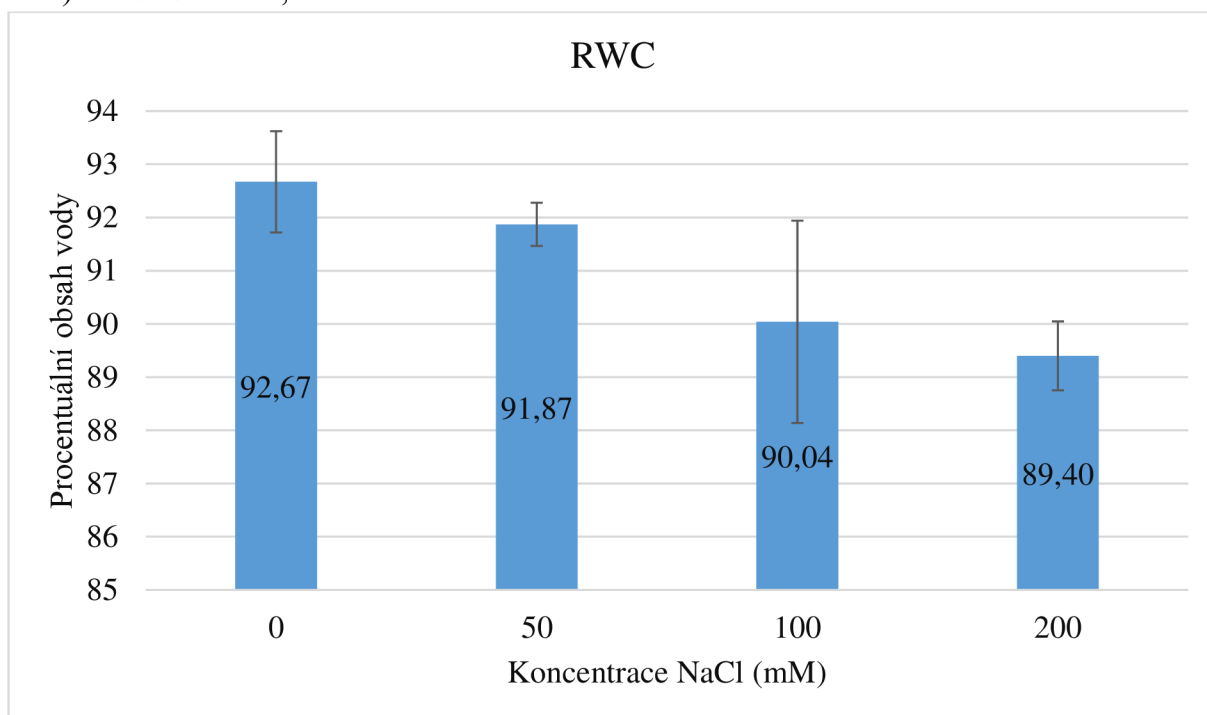
5.3 Vliv solného stresu

Graf 7 zobrazuje vliv chloridu sodného (NaCl) na procentuální přírůstek hmoty testovaných *in vitro* kultur po 21 dnech kultivace. Lze si povšimnout jasného trendu poklesu GI s přibývajícím množstvím soli v živném mediu. U nejméně stresované varianty (200 mM) se procentuální přírůstek dostal do záporných hodnot (Příloha 2 obr. 15–18).



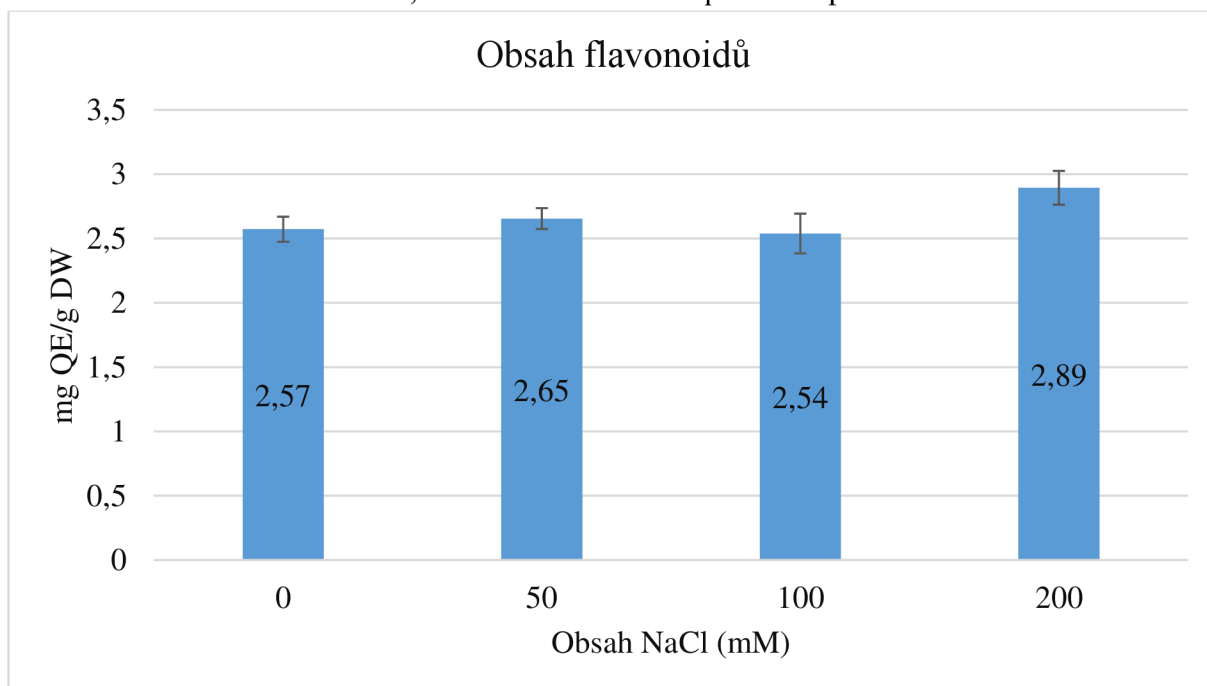
Graf 7: Vliv solného stresu na growth index kalusu.

Na grafu 8 můžeme vidět relativní obsah vody u jednotlivých pokusných variant, vystavených zvyšujícímu se množství NaCl v živném roztoku. S rostoucím obsahem NaCl došlo k postupnému poklesu RWC kalusu. Rozdíl mezi kontrolní a nejvíce stresovanou (200 mM) variantou činí 3,27 %.



Graf 8: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci NaCl v mediu.

Graf 9 zobrazuje obsah flavonoidů v kalusu, kdy byl pozorován mírný růst obsahu těchto sekundárních metabolitů s rostoucí koncentrací chloridu sodného. Výjimkou byla varianta, která obsahovala 100 mM NaCl, kde došlo k mírnému poklesu oproti kontrole.



Graf 9: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci NaCl v mediu.

6 Diskuze

Hlavní náplní experimentální části práce bylo vyhodnocení vlivu regulátorů růstu a jejich koncentrace na tvorbu a růst kalusových kultur. Dále byl vyhodnocován vliv chloridu sodného na růst, obsah vody a obsah flavonoidů u pšenice seté odrůdy 'Bohemia'.

Prvním krokem bylo odvození kalusové kultury jako takové. Z dostupné literatury bylo zjištěno, že jedním z nejčastěji používaných regulátorů růstu se pro indukci tvorby kalusu používá 2,4-D na MS mediu (Rahman et al. 2008; Shah et al. 2003). Rahman et al. (2008) pozorovali vliv koncentrace kyseliny 2,4-D (4; 5 a 6 mg/l) na indukci kalusu u pěti odrůd pšenice seté. Indukce kalusu probíhala z embrya, u tří odrůd se ukázala varianta s 6 mg/l jako nejlepší, ovšem u dalších dvou odrůd měla nejhorší vliv na indukci kalusu. U všech odrůd se tvorba kalusu pohybovala do 10 %, zatímco v této práci množství vzniklých kalusů dosáhlo 27 % z vypreparovaných hypokotylů pšenice seté.

Borjian & Arak (2013) zkoumali vliv různých fytohormonů na iniciaci tvorby kalusu z hypokotylu brukve řepky (*Brassica napus* L.). Jedna z variant obsahovala 1,5 mg/l 2,4-D, a tato koncentrace indukovala tvorbu kalusu u 48,5 % hypokotylů. Možná variabilita tak může být ovlivněna jak rozdílným genotypem, tak různým typem explantátů, z kterých byl kalus indukován, případně může mít vliv i použité medium (Rashid et al. 2002).

Z hlediska dalších látek, které mohou ovlivnit tvorbu kalusu se kromě auxinů používají i cytokininy. Tento vliv byl popsán v práci Baday et al. (2018), kteří porovnávali účinek regulátorů růstu na indukci a růst kalusu u dvou iránských odrůd pšenice ('Alfares' a 'Tamoze-2'). V pokusu byly zkoumány různé koncentrace 2,4-D (0–3,0 mg/l) v kombinaci s různými koncentracemi kinetinu (0–1,2 mg/l). U obou odrůd nejlépe dopadla varianta, která obsahovala 2,5 mg/l 2,4-D a 0,9 mg/l kinetinu. Nejhůře dopadla varianta, která neobsahovala žádný z uvedených regulátorů.

V této práci, při použití kinetinu, dosáhla největšího přírůstku i přes vyšší směrodatnou odchylku varianta s 1 mg/l tohoto cytokininu. Varianta, v níž se nacházelo 0,5 mg/l kinetinu, měla oproti tomu přírůstek menší než kontrola (Graf 4). To nebylo pozorováno u Baday et al. (2018), kde varianty s 0,6 mg/l a 0,3 mg/l kinetinu měly ve srovnání s kontrolou přírůstek vyšší.

Manaf et al. (2016) pozorovali vliv různých koncentrací NAA (0–1,25 mg/l) a cytokininu BAP (0–1,25 mg/l) na růst kalusových kultur ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.). S přibývajícím množstvím BAP se zvyšoval i přírůstek hmoty kalusu. Nejvyšší byl dosažen u varianty, která obsahovala 1 mg/l BAP s 1,0 mg/l NAA, kde procentuální přírůstek hmoty kalusu dosáhl více než 95 %. U varianty s 1,25 mg/l BAP byl však nárůst kalusu menší a pohyboval se pouze okolo 80 %. V tomto pokusu u pšenice seté měl cytokinin BAP podobný účinek na tvorbu kalusu (Graf 4), kde s přibývajícím množstvím BAP se zvyšoval i procentuální přírůstek a téměř 65 % zvýšení zaznamenala varianta s 1 mg/l zmiňovaného cytokininu.

Po optimalizaci živného media z hlediska růstových regulátorů byl testován vliv vzrůstající koncentrace soli na sledované parametry.

Nawara et al. (2017) sledovali vliv zasolení na 6 odrůdách a na 15 hybridech, které byly vytvořeny z několika odrůd pšenice. Kalusy byly pěstovány na MS mediu, které obsahovalo 2,5 mg/l 2,4-D. Jako pokusné varianty byly zvoleny koncentrace 4 a 12 g/l NaCl (\approx 68 a 205

mM), které byly porovnávány s kontrolou bez soli. U hybridních odrůd s přibývajícím koncentrací klesal procentuální přírůstek. Ovšem u dvou odrůd byl přírůstek ve variantě s 12 g/l vyšší než u varianty 4 g/l. Záporný přírůstek nebyl pozorován. Více než polovina variant s obsahem 4 g/l NaCl, zaznamenala více než 50% přírůstek.

V provedeném pokusu s kalusem odrůdy 'Bohemia' u koncentrace 50 mM (\approx 3 g/l) nedosahoval přírůstek ani 40 %. U některých nestresovaných variant byl přírůstek kontrolních variant u Nawary et al. (2017) vyšší než 100 %. Takových hodnot se během pokusu prováděném v této práci nepodařilo dosáhnout (Graf 1; 4 a 7), kontrola u solného stresu pak nezaznamenala ani 50% přírůstek.

Mahmood et al. (2012) také zkoumali vliv osmotického stresu na růst kalusových kultur pšenice seté. Pro vystavení kalusu osmotickému stresu použili polyethylenglykol (PEG). Kalusy s přibývajícím množstvím této látky vykazovaly stejné chování jako kalusy, které byly vystaveny chloridu sodnému (NaCl). Se zvyšující se koncentrací PEG v živném mediu, klesal procentuální přírůstek hmotnosti. V nejvyšším stupni osmotického stresu (-1,2 MPa) byl ve studii pozorován záporný GI. Při vyšší úrovni osmotického stresu může růst buněk kromě nedostatku vody brzdit i toxicita iontů. Stejně chování vykazovaly kalusy v pokusech, které byly prováděny a hodnoceny v rámci této bakalářské práce (Graf 7).

Benderradji et al. (2012) pozorovali ve své studii také podobné chování kalusu vystavenému solnému stresu chloridu sodného přidaného do živného media. Pokus byl prováděn na dvou odrůdách pšenice seté, kde byl porovnáván vliv solného stresu mezi odrůdou citlivou na zasolení ('Mahon-Demias') a odrůdou tolerantní ('Hidhab'). Větší přírůstek zaznamenala odrůda tolerantní, ovšem ani u jedné varianty nebyl pozorován záporný přírůstek. Jak tito autoři popsali, příčinou této variability může být i řada dalších faktorů, jako je například složení media, genotyp rostlin a jejich tolerance vůči solnému stresu a použité explantáty, které ovlivňují procesy týkající se schopnosti indukce kalusů.

Errabbi et al. (2007) zkoumali vliv chloridu sodného a manitolu na růst kalusu u tří kultivarů cukrové třtiny (*Saccharum* sp.). Koncentrace NaCl byla zvolena 50, 100 a 150 mM s 2 mg/l kyseliny 2,4-D. S přibývajícím množstvím chloridu sodného v živném mediu rostl obsah sušiny a zároveň klesal obsah vody v kalusu. Zvyšující se obsah NaCl měl také negativní vliv na GI s přibývajícím množstvím klesal přírůstek. Toto ovlivnění GI chloridem sodným může být způsobeno především akumulací iontů Na^+ a Cl^- . Mírné zvýšení Na^+ a Cl^- v kalusových buňkách by mohlo zabránit ztrátám vody. Pokud je však schopnost buněk rozdělit ionty do vakuol překročena, ionty se hromadí v cytoplazmě a vedou k závažné iontové toxicitě. Stejně chování by tak mohlo vysvětlit zaznamenané výsledky i během tohoto pokusu u pšenice seté (Graf 7).

Relativní obsah vody udává, jaké procentuální množství zaujímá voda v kalusu. Objem vody, který kalus osahuje, může být ovlivněn mnoha faktory, včetně stresu zasolením. Množství soli, které se nachází v živném mediu, může ovlivnit i osmotický potenciál. Voda se tak může stát pro kalus nedostupná a v důsledku nevyrovnaných tlaků může docházet ke ztrátám vody v důsledku osmotického gradientu. Voda putuje z oblasti nižšího obsahu rozpuštěných látek do oblastí s vyšší koncentrací. Chlorid sodný v živném roztoku může při vysokých koncentracích způsobovat toxicitu. Ionty sodíku a chloru může rostlina přirozeně přijímat, aby vyrovnala osmotický tlak. Ovšem vysoký obsah těchto látek v rostlinných buňkách je nežádoucí a způsobuje toxicitu v buňkách. (Isayenkov & Maatuis 2019). Tento jev

mohl nastat i u pozorovaných kalusů, kdy s přibývajícím koncentrací NaCl v živném mediu bylo zaznamenáno i nižší RWC v testovaných kulturách (Graf 8).

Kromě růstových parametrů byl u kalusů odrůdy 'Bohemia' sledován celkový obsah flavonoidů. Xuan et al. (2023) pozorovali vliv fytohormonů (kinetin, BAP, 2,4-D) na produkci flavonoidů v laskavci (*Amaranthus* ssp.). S přibývajícím množstvím BAP (0–9 mg/l) nebyl pozorován vliv na produkci flavonoidů, která se v pokusu pohybovala okolo hodnoty 2 mg/g sušiny. Oproti tomu v pokusu provedeném na pšenici byl zaznamenán postupný ubytok obsahu flavonoidů se zvyšující se koncentrací BAP (Graf 6). Xuan et al. (2023) také sledovali vliv kinetinu (0–4 mg/l), kdy s jeho zvyšujícím se množstvím v živném mediu pozvolna klesal obsah flavonoidů. V pokusu u odrůdy 'Bohemia' byl zaznamenán určitý nárůst obsahu těchto látek u koncentrace s 0,5 mg/l kinetinu.

Z hlediska 2,4-D se nárůst pohyboval pouze u varianty s 6 mg/l byl obsah více než 2 mg/g sušiny (Graf 3). Xuan et al. (2023) rovněž zaznamenali pozitivní vliv oproti kontrole.

Kiani et al. (2021) pozorovali množství flavonoidů v mnohoštetu válcovitého (*Aegilops cylindrica* L.), který je blízký příbuzný pšenice seté. Solný stres byl vyvolán chloridem sodným o koncentraci 250 mM. V jejich studii uvádějí, že obsah těchto polyfenolických látek v důsledku solného stresu stoupá a rostlina tak reaguje na vzniklý stres a tvorbu volných radikálů v rostlině. Flavonoidy fungují jako absorbátor volných radikálů a zvyšují toleranci vůči solnému stresu Tohidi et al. (2017).

Toto tvrzení bylo v bakalářské práci jen částečně potvrzeno. V pokusu, kdy byl pozorován možný solný stres a jeho vliv na produkci flavonoidů, byl nejvyšší obsah těchto látek nejvíce ve variantě NaCl 200 mM. Ovšem ve variantě, která obsahovala druhé největší množství soli (100 mM), byl obsah flavonoidů v porovnání s kontrolou o něco nižší (Graf 9).

Zhao et al. (2009) pozorovali vliv solného stresu (0–300 mM NaCl) na kalusové kultury u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) a *Thellungiella halophila* (Pallas). Huseníček ve variantách, které obsahovaly chlorid sodný, zaznamenal téměř shodný obsah flavonoidů, kontrola obsahovala polovinu těchto látek. Ovšem *Thellungiella halophila* obsahoval v kontrole a při 50 a 200 mM téměř shodné množství. U varianty se 100 mM byl zaznamenán zvýšený obsah flavonoidů, varianta s 300 mM jich obsahovala nejméně.

7 Závěr

V bakalářské práci byla sledována kalusová kultura pšenice seté odrůdy 'Bohemia', u které byl hodnocen vliv regulátorů růstu a solného stresu na vybrané parametry jako index růstu (growth index, GI), obsah vody (relative water content, RWC) a celkový obsah flavonoidů (TFC).

Regulátory růstu

- Bylo potvrzeno, že použití 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4-D) v koncentraci 4 mg/l v MS mediu mělo pozitivní vliv na tvorbu kalusů u separovaných hypokotylů vybrané odrůdy.
- 2,4-D poté se zvyšující se koncentrací v mediu pozitivně ovlivnila GI (growth index) u jednotlivých variant. Nejlepší přírůstek zaznamenala varianta s 10 mg/l, ale s přihlédnutím k směrodatným odchylkám a dalším parametrům (RWC) byla pro následující pokusy vybrána varianta s 8 mg/l tohoto auxinu.
- Z hlediska vlivu na tvorbu flavonoidů, způsobila aplikace s 6 mg/l 2,4-D nejvyšší nárůst obsahu těchto sekundárních metabolitů. U ostatních varianty byly naměřeny nižší a podobné hodnoty.
- RWC se mezi variantami s různými koncentracemi 2,4-D příliš nelišil.
- Následné porovnání vlivu různých koncentrací dvou cytokininů ukázalo, že zejména BAP měla pozitivní vliv na růst kultur se vzrůstajícím množstvím v živném mediu.
- U varianty BAP (1 mg/l) byl zaznamenán nejvyšší pokles flavonoidů, zatímco v případě kinetinu (0,5 mg/l) byl průměrný obsah nejvyšší, nicméně se příliš nelišil od kinetinu 1 mg/l nebo BAP (0,1 mg/l).
- S přibývajícím množstvím cytokininů RWC postupně klesal.

Zasolení

- U solného stresu s přibývající koncentrací NaCl klesal procentuální přírůstek, u nejméně stresované varianty se GI dostal do záporných čísel, značící nedostatek vody pro růst nebo toxicitu iontů.
- Stejný jev byl pozorován u relativního obsahu vody, kdy s přibývajícím množstvím NaCl v živného mediu klesl RWC v kalusu pod 90 %.
- U TFC se ukázalo, že s přibývajícím množstvím chloridu sodného stoupal i obsah těchto sekundárních metabolitů. Výjimkou byla varianta 100 mM NaCl, kde množství flavonoidů bylo o něco nižší ve srovnání s kontrolou.

V pozorovaných měřeních se ukázalo, že nastavení podmínek pro pěstování kalusu je důležitým faktorem a mohly být vyzkoušeny i další zástupci růstových regulátorů. Tato kultura pak může být využita i pro testování dalších typů stresů.

8 Literatura

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleira HAR. 2017. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* **20**(8): 1689-1699.
- Ammar MK, Hanafi RS, Choucry MA, Handoussa H. 2023. Structural, functional, nutritional composition and analytical profiling of *Triticum aestivum* L. *Applied Biological Chemistry* **66**(1): 48.
- Anikina I, et al. 2023. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Frontiers in Plant Science* **14**: 1163270.
- Ashraf A, et al. 2022. Effect of different media compositions of 2, 4-d, dicamba, and picloram on callus induction in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2022(1)
- Baday SJ. 2018. *In vitro* study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *Agric. J* **13**(3): 67-71.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Cereals and cereal products. *Food chemistry*, 670-745.
- Benderradji L, Brini F, Kellou K, Ykhlef N, Djekoun A, Masmoudi K, Bouzerzour H. 2012. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Bera K, Dutta P, Sadhukhan S. 2022. Plant responses under abiotic stress and mitigation options towards agricultural sustainability. Pages 3-28. In *Plant stress: challenges and management in the new decade*. Springer International Publishing, Cham.
- Bhojwani SS, Dantu PK. 2013. *Plant tissue culture: an introductory text*. India: Springer.
- Borjian L, Arak H. 2013. A study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D, and Kinetin) on callus induction in *Brassica napus*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, **5**(4), 519-521.
- Das NR. 2008. *Wheat crop management*. Scientific Publishers, Jodhpur.
- Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS. 2021. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules* **26**(17): 5377.
- Efferth T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 2019, **5**(1): 50-59.
- Errabii T, Gandonou CB, Essalmani H, Abrini J, Idaomar M, Skali Senhaji N. 2007. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**: 95-102.
- Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* **248**: 1-18.

- Grau J. 1998. Trávy: lipnicovité, šachorovité, sítinovité a rostliny podobné travám Evropy. Knižní klub, Praha
- Grosser JW, Calovic M, Louzada ES. 2010. Protoplast fusion technology—somatic hybridization and cybridization. *Plant Cell Culture*, John Wiley & Sons, Ltd, 175-198.
- Gull A, Lone AA, Wani NU I. 2019. Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-19.
- Hartung W, Sauter A, Hose E. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?. *Journal of experimental botany* **53**(366): 27-32.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell* **25**(9): 3159-3173.
- Iliev I, Gajdošová A, Libiaková G, Jain SM. 2010. Plant micropropagation. *Plant cell culture: essential methods*, **1**: 1-23.
- Isayenkov SV, Maathuis FJM. 2019. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in plant science* **10**: 435515.
- Isayenkov SV. 2012. Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics* **46**(5): 302-318.
- Kazda J, Jindra Z, Kabíček J, Prokinová E, Ryšánek P. 1997. Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. *Farmář*, Praha.
- Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin*. Profi Press, Praha.
- Kiani R, Arzani A, Mirmohammady Maibody SAM. 2021. Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids. *Frontiers in plant science* **12**: 646221.
- Kieber JJ, Schaller, GE. 2014. Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12.
- Kumar A, Prasad B, Bharati A, Kumar A. 2017 *Botanical description of Wheat*. *Wheat a Premier Food Crop*, 23.
- Mahmood I, Razzaq A, Hafiz IA, Kaleem S, Khan AA, Qayyum A, Ahmad M. 2012. Interaction of callus selection media and stress duration for *in vitro* selection of drought tolerant callus of wheat. *African Journal of Biotechnology* **11**(17): 4000-4006.
- Manaf HH, Rabie KA, Ibrahim IS, Eltantawy ME. 2016. Effects of BAP, NAA and NaCl on growth characters and silymarin concentration of *Silybum marianum* callus. *J Biol Chem Environ Sci* **11**(4): 139-151.
- Manghwar H, Hussain A, Ali Q, Liu F . 2022. Brassinosteroids (BRs) role in plant development and coping with different stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **23**(3): 1012.
- Máthé A, Hassan F, Abdul Kader A. 2015. *In vitro* micropropagation of medicinal and aromatic plants. *Medicinal and Aromatic Plants of the World: Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects*, 305-336.

- Mukherjee A, Gaurav AK, Singh S, Yadav S, Bhowmick S, Abeysinghe S, Verma JP. 2022. The bioactive potential of phytohormones: A review. *Biotechnology Reports* **35**: e00748. DOI: 10.1016/j.btre.2022.e00748
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. University of Wisconsin, Wisconsin.
- Murthy HN, Joseph KS, Peak KY, Park SY. 2023. Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in plant science* **14**: 1159588.
- Mustafa SK, Oyouni AAWA, Aljohani MM, Ahmad MA. 2020. Polyphenols more than an Antioxidant: Role and Scope. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 14(1).
- Nawara HM, Mattar MZ, Salem KFM, Eissa OA. 2017. Diallel study on some *in vitro* callus traits of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *Int J Agric Environ Res* **3**(1): 1988-2006.
- Oklestkova J, Rárová L, Kvasnica M, Strnad M. 2015. Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochemistry reviews* **14**: 1053-1072.
- Osugi A, Sakakibara H. 2015. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?. *BMC biology* **13**: 1-10.
- Piotrowska A, Bajguz A. 2011. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**(17): 2097-2112.
- Rahman MM, Shamsuddin AKM, Asad U. 2008. *In vitro* regeneration from mature embryos in spring wheat.
- Rashid H, Ghani RA, Chaudhry Z, Naqvi SMS, Quraishi A. 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*, **1**(1), 49-54.
- Ribeiro IG, Castro TCD, Coelho MGP, Albarello N. 2021. Effects of different factors on friable callus induction and establishment of cell suspension culture of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). *Rodriguésia* **72**: e00102020. DOI: 10.1590/2175-7860202172105.
- Rowe JH, Topping Jf, Liu J, Lindsey K. 2016. Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist* **211**(1): 225-239.
- Samanta A, Das G, Das SK. 2011. Roles of flavonoids in plants. *Carbon* **100**(6): 12-35.
- SELGEN, a. s. 2010. Bohemia metodika pro praxi. SELGEN, a. s.. Available from <https://selgen.cz/wp-content/uploads/2021/07/BOHEMIE-brozura-2010.pdf> (accessed February 2024).
- Serfling A, Kopahnke D, Habekuss A, Novakazi F, Ordon F. 2016. Wheat diseases: an overview. Burleigh Dodds Science Publishing.
- Sezgin M, Kahya M. 2018. Phytohormones. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology* **8**(1): 35-39.

- Shah MI, Jabeen MUSSARAT, Ilahi, IHSAN. 2003. In vitro callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. LU-26S. *Pak. J. Bot.* **35**(2), 209-217.
- Shevkani K, Singh N, Bajaj R, Kaur A. 2017. Wheat starch production, structure, functionality and applications—a review. *International Journal of Food Science & Technology* **52**(1): 38-58.
- Schaller GE, Kieber JJ. 2002. Ethylene. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 1.
- Smith RH. 2013. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. academic press.
- Takahashi N, Phinney BO, Macmillan J. 2012. *Gibberellins*. Springer Science & Business Media.
- Thakur P, Kumar K. 2019 Nutritional importance and processing aspects of pseudo-cereals. *Journal of Agricultural Engineering and Food Technology* **6**(2): 155-160.
- Thorpe TA. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology* **37**: 169-180.
- Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food chemistry* **220**: 153-161.
- Tsanova-Savova S, Ribarova F, Petkov V. 2018. Quercetin content and ratios to total flavonols and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Bulg Chem Commun* **50**(1): 69-73.
- Upadhyaya H, Sahoo L, Panda, SK. 2013. Molecular physiology of osmotic stress in plants. Pages 179-192 In *Molecular stress physiology of plants*. India: Springer India.
- Vaněk V, Balík J, Pavlíková D, Tlustoš P. 2007. *Výživa polních a zahradních plodin*. Profí Press, Praha.
- Venclová B. 2023. Pšenice – významná komodita ve světě a v Evropské unii. Profí Press. Available from <https://uroda.cz/psenice-vyznamna-komodita-ve-svete-a-v-evropske-unii/> & <https://uroda.cz/produkce-psenice-v-ceske-republice-v-roce-2022/> (accessed March 2024)
- Wawrosch Ch, Zotchev SB. 2021. Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**(18): 6649-6668.
- Xuan Y, Liu S, Xie L, Pan J. 2023. Establishment of *Amaranthus* spp. calluses and cell suspension culture, and the effect of plant growth regulators on total flavonoid content. *Tropical Plants*, **2**(1).
- Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L. 2006. Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New phytologist* **171**(2): 293-303.

- Zhao X, Tan HJ, Liu YB, Li XR, Chen GX. 2009. Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **98**: 97-103.
- Zimolka J, Edler S, Hřivna L, Jánský J, Kraus P, Mareček J, Novotný F, Richter R, Říha K, Tichý F. 2005. Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. Profí Press, Praha.
- Zulkarnain Z, Tapingkae T, Taji A. 2015. Applications of *in vitro* techniques in plant breeding. *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools*, 293-328.
- Zwanenburg B, Pospíšil, T, Čavar Zeljković S. 2016. Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta* **243**: 1311-1326.

Zdroje obrázků

- Ammar MK, Hanafi RS, Choucry MA, Handoussa H. 2023. Structural, functional, nutritional composition and analytical profiling of *Triticum aestivum* L. *Applied Biological Chemistry* **66**(1): 48.
- Busi R, et al. 2018. Weed resistance to synthetic auxin herbicides. *Pest management science* **74**(10): 2267.
- Doležel J. 2014. Genom pšenice. Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., a Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc. Available from <http://abicko.avcr.cz/2014/12/03/index.html> (accessed March 2024).
- Frick EM, Strader LC. 2018. Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany*.
- Jameson PE. 2023. Zeatin: The 60th anniversary of its identification. *Plant Physiology* **192**(1): 35.
- Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J. 2019. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules* **24**(2): 370.
- Stehlík V, et al. 1977. *Naučný slovník zemědělský 7 P. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství*. Praha. s

9 Seznam obrázků a grafů

Seznam obrázků

Obr. 1: Růst a vývoj pšenice seté (Stehlík et al. 1977).....	11
Obr. 2: Fylogeneze pšenice seté (Doležel 2014)	12
Obr. 3: Kalusová kultura (Zdroj: Autor práce).....	17
Obr. 4: Strukturní vzorec IAA (převzato od Frick & Stander 2018).....	18
Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny 2,4-D (převzato od Busi et al. 2018).....	19
Obr. 6: Strukturní vzorce cytokininů (převzato od Jameson 2023).....	19
Obr. 7: Klasifikace polyfenolů Obr. 8: Strukturní vzorce flavonoidů	23
Obr. 9: Naklíčená semena a vypreparované hypokotyly	I
Obr. 10: Růst kalusu (první pasážování až velikost pro první pokus, pasáž 11)	I
Obr. 11: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 0 mg/l BAP (0.-21. den)	II
Obr. 12: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 1 mg/l BAP (0.-21. den)	II
Obr. 13: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 0 mg/l Kinetinu (21. den)	II
Obr. 14: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 1 mg/l Kinetinu (21. den)	III
Obr. 15: 0 mM NaCl (21. den).....	III
Obr. 16: 50 mM NaCl (21. den).....	III
Obr. 17: 100 mM NaCl (21. den).....	IV
Obr. 18: 200 mM NaCl (21. den).....	IV

Seznam grafů

Graf 1: Vliv regulátoru růstu 2,4-D na growth index kalusu.....	28
Graf 2: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci 2,4-D v mediu.	29
Graf 3: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci 2,4-D v mediu.....	29
Graf 4: Vliv cytokininů na growth index kalusu.	30
Graf 5: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci cytokininů v mediu.....	31
Graf 6: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci cytokininů v mediu.....	31
Graf 7: Vliv solného stresu na growth index kalusu.....	32
Graf 8: Relativní obsah vody (RWC) v závislosti na koncentraci NaCl v mediu.	33
Graf 9: Obsah flavonoidů v závislosti na koncentraci NaCl v mediu.	33

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

- 2,4-D – 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
- BAP – 6-benzylaminopurin
- DW – hmotnost sušiny
- FW0 – hmotnost kalusu v 0. den
- FW1 – hmotnost kalusu v 21. dnu
- GI – growth index
- IAA – kyselina indol-3-octová
- Kin – kinetin
- MS medium – Murashige and Skoog medium (1962)
- NAA – kyselina naftyloctová
- RWC – relativní obsah vody
- TFC – celkový obsah flavonoidů

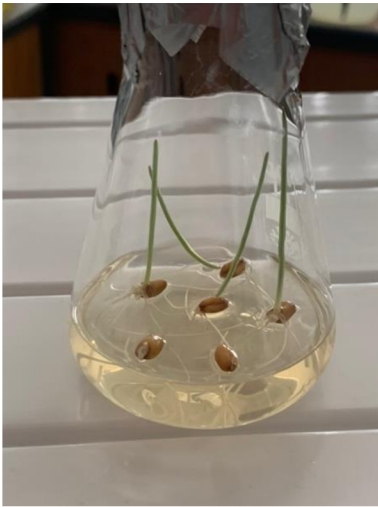
11 Samostatné přílohy

Příloha 1 – Složení MS media

Makroelementy	mg/l
Dusičnan draselný – KNO ₃	1 900
Dusičnan amonný – NH ₄ NO ₃	1 650
Chlorid vápenatý – CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440
Síran hořečnatý – MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370
Dihydrogenfosforečnan draselný – KH ₂ PO ₄	170
Mikroelementy	
Disodná sůl EDTA – Na ₂ EDTA	37,24
Síran železnatý – FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84
Síran manganatý – MnSO ₄ . H ₂ O	16,9
Kyselina boritá – H ₃ BO ₃	6,2
Síran zinečnatý – ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6
Molybdenan sodný - Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25
Síran měďnatý – CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025
Chlorid kobalnatý – CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025
Jodid draselný – KI	0,83
Vitamíny	
Kyselina nikotinová	0,5
Thiamin	0,1
Pyridoxin	0,5
Ostatní složky	
Sacharóza	30 000
Hydrolyzát kaseinu	1 000
Myo-inositol	100
Glycin	2
(Agar – pro ztužení media)	8000

(Murashige & Skoog 1962)

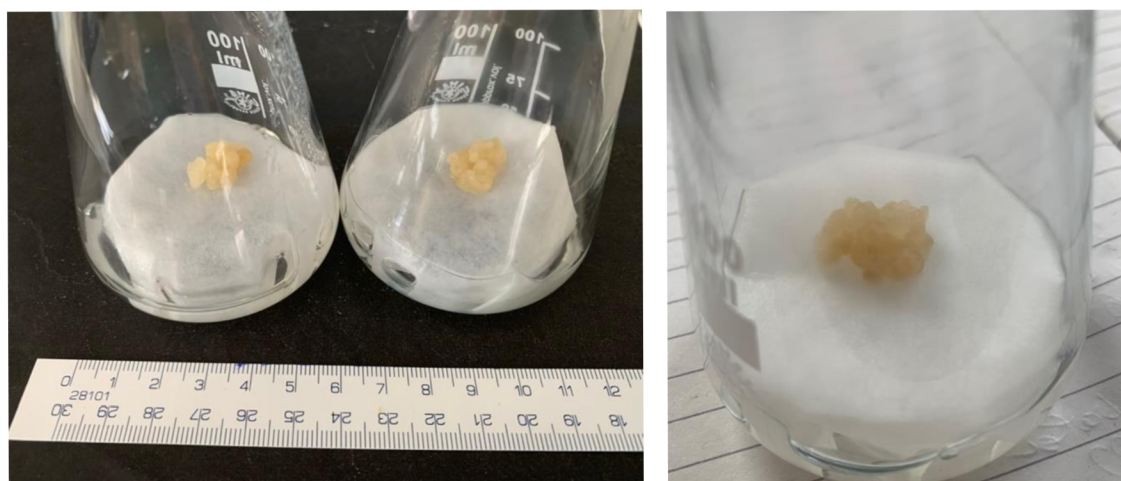
Příloha 2 – Fotodokumentace pokusu



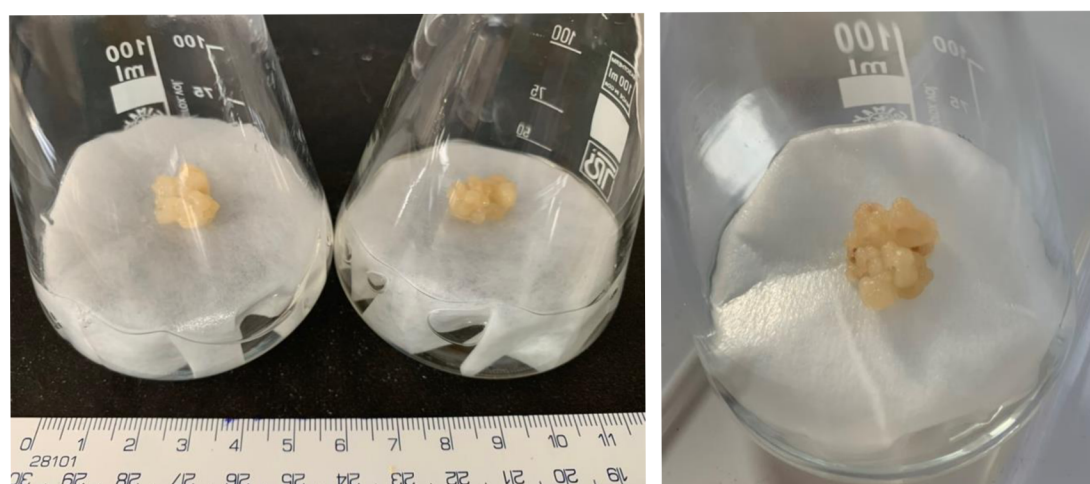
Obr. 9: Naklíčená semena a vypreparované hypokotyly



Obr. 10: Růst kalusu (první pasážování až velikost pro první pokus, pasáž 11)



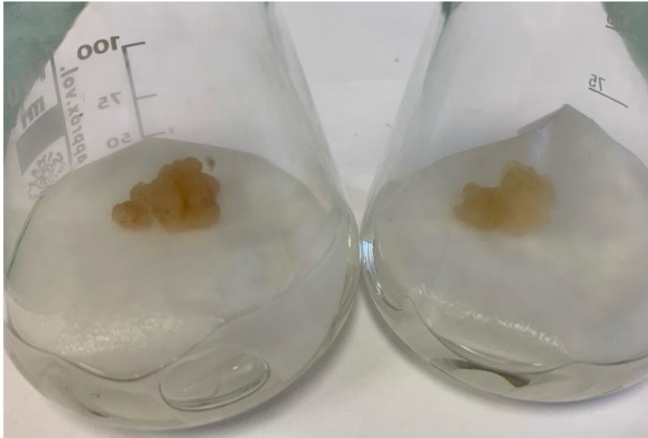
Obr. 11: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 0 mg/l BAP (0.-21. den)



Obr. 12: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 1 mg/l BAP (0.-21. den)



Obr. 13: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 0 mg/l Kinetinu (21. den)



Obr. 14: 8mg/l kyseliny 2,4-D a 1 mg/l Kinetinu (21. den)



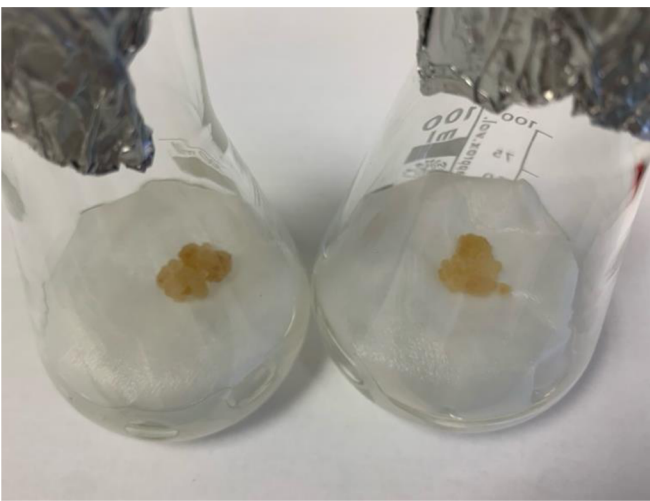
Obr. 15: 0 mM NaCl (21. den)



Obr. 16: 50 mM NaCl (21. den)



Obr. 17: 100 mM NaCl (21. den)



Obr. 18: 200 mM NaCl (21. den)