



Faktory indukce tvorby hlíz lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) v *in vitro* podmínkách
Diplomová práce

Vedoucí práce:
RNDr. Ing. Marek Klemš Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Jana Kůrková



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Jana Kůrková**
Studijní program: Fytotechnika
Obor: Biotechnologie rostlin
Název tématu: **Faktory indukce tvorby hlíz lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v in vitro podmínkách**
Rozsah práce: 40 textových, 10 grafických stran

Zásady pro vypracování:

1. Indukce tuberizace bramboru (*Solanum tuberosum* L.) in vitro je významným biotechnologickým přístupem při produkci certifikované sadby a uchování genových zdrojů. Studium fyziologické podstaty tvorby hlíz v in vitro podmínkách umožňuje posoudit vliv vnějších a vnitřních faktorů procesu. Optimalizace indukce tvorby hlíz pak umožňuje získat zdravou a vitální sadbu.
2. Připravte literární rešerši zabývající se studiem faktorů, které mají bezprostřední vliv na průběh tuberizace. Zaměřte se na produkci sadby a její požadované vlastnosti.
3. Experimentálně stanovte kritickou délku pro indukcii tvorby hlíz in vitro za podmínek sníženého obsahu dusíku v indukčním médiu. Sledujte anatomické, morfologické a morfogenetické změny, frekvenci tvorby hlíz a růstové parametry procesu tuberizace.
4. Stanovte obsahy fytohormonů, které mají vliv na indukcii a průběh tuberizace lilku bramboru v jednotlivých částech rostlin, pomocí instrumentálních a imunoanalytických metod. Stanovte obsah dusíku v médiu a v explantátech in vitro.
5. Získané výsledky vhodně zpracujte matematicko-statistickými metodami a diskutujte s poznatky jiných autorů.

Seznam odborné literatury:

1. PRINGLE, R. – BISHOP, C. – CLAYTON, R. Potatoes postharvest. Cambridge, MA. 2009. ISBN 978-0-85199-502-1. URL: <http://dx.doi.org/10.1079/9780851995021.0000>.
2. HAWKES, J G. *The potato : evolution, biodiversity and genetic resources*. Londýn: Belhaven Press, 1990. 259 s. ISBN 1852930454.
3. GEORGE, R A T. *Vegetable seed production*. 3. vyd. Wallingford: CABI, 2009. 320 s. ISBN 978-1-84593-521-4.
4. HOSSAIN, J. *Potato Microtuber: A Prospective: Production and Dormancy Breaking of Potato Microtuber*. Germany: Lambert Academic Publishing AG & Co. KG, 2012. 386 s.
5. VOKÁL, B. *Brambory: šlechtění, pěstování, užití, ekonomika*. Praha: Profi Press, 2013. 160 s. ISBN 978-80-86726-54-0.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2014

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

L. S.



Bc. Jana Kůrková
Autorka práce





Ing. RNDr. Marek Klemš, Ph.D.
Vedoucí práce



prof. RNDr. Ladislav Hayel, CSc.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Faktory indukce tvorby hlíz lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) v *in vitro* podmínkách

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Ing. Marku Klemšovi Ph.D. za čas, který mně věnoval a cenné rady. Dále bych poděkovala Dr. Ing. Heleně Fišerové za stanovení produkce etylenu, etanu a CO₂. Ing. Petru Kalouskovi Ph.D. za ochotu a pomoc při přípravě mikroskopických preparátů. V neposlední řadě nesmím zapomenout na Ing. Kamilu Lónovou, která mě podporovala a pomáhala při pokusech do mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá faktory indukce tvorby hlíz lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) v *in vitro* podmínkách. Cílem bylo sledovat kultivaci jednonodálních segmentů lodyh na indukčním médiu se sníženým obsahem anorganického dusíku na 12 μmol , 80 g/l sacharózy a přidavku 10 mg/l BA pro tvorbu hlíz. Byla hodnocena frekvence tuberizace, morfologické změny, velikost a hmotnost hlíz. Byly založeny tři skupiny explantátů, lišící se délkou kultivace na indukčním médiu. Byly sledovány změny v obsahu endogenní ABA v jednonodálním segmentu lodyhy a ve stolonu. Sledovaly se změny v obsahu endogenních cytokininů, dále pak obsah dusíku, produkce etylenu, etanu a CO_2 . Byly připraveny trvalé mikroskopické preparáty zachycující přeměnu axilárního pupenu ve stolon, resp. hlízu. Zvýšený obsah ABA v době tvorby hlíz dokládá její vliv na tuberizaci. Největší vliv z cytokininů na tuberizaci má BA, iP a iPR. A naopak nulový vliv měl Z a ZR. Obsah etylenu, etanu, CO_2 a dusíku souvisí s délkou kultivace na indukčním médiu.

Klíčová slova: lilek brambor, tuberizace, ABA, CK, dusík, etylen

This thesis deals with the factors responsible for induction of the formation of tuber potato (*Solanum tuberosum L.*) in *in vitro* conditions. The aim was to observe cultivation of the nodal segments of stems on the induction medium with reduced content of inorganic nitrogen 12 μmol , 80 g/l sucrose and the addition of 10 mg/l BA for the formation of tubers. The frequency of tuberisation was evaluated, as well as morphological changes, size and weight of the tubers. Three groups of explants were established differing in length of cultivation on the induction medium. These were monitored for changes in the content of endogenous ABA in the nodal segments of stem and stolon. Monitoring of the changes in content of endogenous cytokinin, nitrogen content, production of ethylene, ethane and CO_2 was performed as well. Permanent microscopic preparations were prepared to detect transformation of the axillary bud into stolon, resp. tuber. Increased content of ABA during the tuber formation demonstrates its effect on tuberization. Amongst cytokinins, the biggest effect of cytokinins on tuberization has BA, iP and iPR. Conversely, Z and ZR had no influence. Contents of ethylene, ethane, CO_2 and nitrogen are related to the length of culturing on the induction medium.

Key words: potato, tuberization, ABA, CK, nitrogen, ethylene

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL PRÁCE.....	12
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
3.1	Tuberizace	13
3.2	Vnitřní faktory tvorby hlíz na tuberizaci.....	14
3.2.1	Hormonální regulace tvorby hlíz	14
3.2.2	Účinek auxinů	15
3.2.3	Účinek gibberelinů.....	15
3.2.4	Účinek cytokininů.....	16
3.2.5	Účinek kyseliny abscisové.....	17
3.2.6	Kyselina jasmonová.....	18
3.2.7	Etylén.....	19
3.3	Vnější faktory na indukci tvorby hlíz.....	19
3.3.1	Sacharóza	20
3.3.2	Fotoperioda	21
3.3.3	Teplota	21
3.3.4	Vliv minerální výživy	22
3.3.5	Vliv vlhkosti	23
3.4	Chemické složení hlíz	23
3.5	Dormance hlíz	24
3.5.1	Dormance a skladování hlíz.....	25
3.5.2	Vliv vnitřních faktorů na průběh dormance.....	27
3.5.3	Vliv auxinů na dormanci hlíz.....	27
3.5.4	Vliv cytokininů na dormanci hlíz	27
3.5.5	Vliv gibberelinů na dormanci hlízy	28
3.5.6	Vliv kyseliny abscisové na dormanci	29
3.5.7	Vliv etylénu na dormanci hlíz.....	30
3.6	Vliv vnějších faktorů na dormanci	30
3.6.1	Vliv teploty na dormanci hlíz	31
3.6.2	Vliv světla a sacharózy na dormanci hlíz	31
3.7	Sadba brambor	32

3.8	Certifikace sadby brambor	32
3.8.1	Požadavky na množitelské porosty a sadbu brambor	33
3.8.2	Poznátky o produkci sadby brambor v podmínkách <i>in vitro</i>	35
3.8.3	Výzkumné ústavy zabývající se šlechtěním, produkcí a udržováním sadby brambor 37	
3.9	Analytika biologicky významných látek v procesu morfogeneze hlíz	40
3.9.1	Princip RIA při stanovení kyseliny abscisové	40
3.10	Stanovení produkce etylénu, ethanu a CO ₂ metodou plynové chromatografie 41	
3.11	Stanovení dusičnanových iontů v médiu za použití spektrofotometrie	42
4	MATERIÁL A METODIKA	43
4.1	Rostlinný materiál a kultivace.....	43
4.2	Média.....	44
4.3	Stanovení cytokininů.....	44
4.3.1	Extrakce, purifikace a HPLC separace CK.....	45
4.3.2	Postup ELISA stanovení	45
4.4	Stanovení obsahu ABA metodou RIA	46
4.4.1	Extrakce ABA z rostlinného materiálu	46
4.4.2	Postup radioimunoanalýzy byl následující:	46
4.5	Příprava trvalého mikroskopického preparátu	47
4.5.1	Příprava vzorků.....	47
4.5.2	Cajal-Brožkovo barvení (podle Němce <i>et al.</i> 1962):.....	48
4.5.3	Pořízení mikrofotografií	48
4.6	Stanovení produkce etylenu, etanu a CO ₂	48
4.7	Stanovení amonného dusíku s Nesslerovým činidlem absorpční spektrofotometrií	49
4.7.1	Příprava vzorků.....	49
4.7.2	Stanovení NH ₄ ⁺	49
4.7.3	Stanovení NO ₃ ⁻	50
4.8	Statistika hodnocení	50
4.9	Fotodokumentace	50
5	VÝSLEDKY.....	51
5.1	Morfologické změny v průběhu tuberizace.....	51
5.1.1	Hodnocení frekvence tuberizace.....	54

5.1.2	Statistické vyhodnocení frekvence tuberizace	55
5.1.3	Hmotnost a velikost hlíz	56
5.2	Anatomické a histologické změny v procesu tuberizace	59
5.3	Změny obsahu růstových regulátorů v průběhu tvorby hlíz	62
5.3.1	Změny v obsahu ABA v jednonodálním segmentu a ve stolonu.....	62
5.3.2	Hodnocení produkce etylenu, etanu a CO ₂	64
5.3.3	Porovnání dvou skupin explantátů v obsahu cytokininů	67
5.3.4	Obsah dusíku v jednonodálních segmentech lodyh a médiu	72
6	DISKUSE	75
7	ZÁVĚR.....	80
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	82
8.1	Internetové zdroje.....	95
9	SEZNAM GRAFŮ	96
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	98
11	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	99

1 ÚVOD

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří mezi plodiny s dlouhou historií pěstování. Brambory s největší pravděpodobností pocházejí z oblasti pohoří And v Jižní Americe. Byly domestikovány v Peru a Bolívii zhruba před 8000 až 5000 lety před našim letopočtem. Do Evropy je přivezli Španělé v 16. století po objevení Ameriky. Trvalo téměř 200 let, než se brambory začaly rozšiřovat jako lidská potrava. Poté se rozšířily do celého světa a staly se základní potravinou lidstva. V Evropě se lilek brambor stal oblíbenou plodinou mezi obyvateli. Byl používán jako základní potravina při nedostatku obilovin v době hladomoru. Pěstování brambor v 19. století zabránilo v Evropě cyklickým hladomorům a epidemiím kurdějí. Dokonce byl zjištěn nárůst počtu obyvatel v oblastech, kde se brambor pěstoval (BROWN a HENFLING 2014). Novodobá historie brambor se začala rozvíjet před dvaceti lety, kdy se změnilo jejich pěstování a odrůdová skladba. Brambory se přestaly pěstovat ke krmení hospodářských zvířat a omezilo se jejich využití na výrobu škrobu a lihu takové jako bylo v 90. letech. Pěstování brambor v České republice má dlouholetou tradici. Výroba nativního bramborového škrobu má na dnešním území České republiky tradici od poloviny 19. století, kdy byly brambory zpracovávány na škrob jako přidružená výroba velkostatků. Brambory zpracované na bramborový škrob mají všestranné využití v potravinářském, textilním a papírenském průmyslu. V současné době fungují u nás čtyři provozovny zabývající se produkcí škrobu z brambor, které plně svou kapacitou nahrazují původních sedmnáct škrobáren, které škrob vyráběly na území naší republiky v 80. letech minulého století. Brambory jsou zlepšující plodinou v osevním postupu. Pěstební plochy brambor neustále klesají, před deseti lety plochy brambor představovaly 40 000 ha, přičemž v současné době se jedná o něco kolem 30 000 ha. Průměrný výnos brambor na hektar v letech 2006 – 2011 je 28,67 tun/ha. V letech 2012 – 2015 byl průměrný výnos 26,47 tun/ha.

Lilek brambor je víceletá hlíznatá rostlina z čeledi lilkovité (*Solanaceae*), pěstovaná jako jednoletá plodina. Vyrůstá do výšky 50-100 cm, výjimečně až do výšky 1,5 m. Je to bylina s hranatou, bohatě větvenou lodyhou, s přímou nebo i poléhavou, s krátkými trichomy. Listy jsou lichozpeřené mírně ochlupené 20 až 30 cm dlouhé. Květy nejčastěji bílé až fialové se sytě žlutými až oranžovými prašníky. Plody jsou žluté až zelené bobule o velikosti 2 až 4 cm, které uvnitř obsahují bílá semena. Podzemní část je charakteristická svazčitými kořeny s hlízami elipsovitého nebo nepravidelného

tvaru. Pokožka hlíz je okrově žlutá až světle hnědá nebo u některých kultivarů červená až červenofialová. S výjimkou hlíz je celá rostlina jedovatá. Brambory se množí převážně vegetativně hlízami nebo také v menší míře generativně. Lilek brambor se pěstuje zejména pro podzemní hlízy, které vznikají metamorfózou stonku. Existuje celá řada kultivarů, které se liší podle doby zralosti hlíz na rané, polorané a pozdní odrůdy. Dále podle využití na konzumní a průmyslové. Také se liší tvarem hlíz na kulovité nebo rohlíčkovité, barvy slupky a konzistence dužniny.

Název brambor se u nás používá pro kulturní, polokulturní a příbuzné plané druhy rodu *Solanum*. Brambory patří mezi nejdůležitější zemědělské plodiny hned po rýži, pšenici a kukuřici. Cílem výzkumu je pochopit proces tuberizace a vývoj hlíz (JACKSON 1999). V České republice se zkonzumuje na 70 kg brambor na osobu, což nás řadí na přední místa ve světě. Brambory obsahují řadu nutričně významných látek. Jsou bohaté na minerály, vitaminy, bílkoviny a jsou téměř bez tuku. Hlíza bramboru obsahuje v závislosti na odrůdě, termínu sklizně, délky a způsobu skladování asi 20 % sušiny a 80 % vody. Sušina je tvořena převážně sacharidy 11-18 %, dusíkatými látkami 2 % a minimem tuků 0,1 %.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo sledovat morfo-genetické změny v procesu tuberizace u lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) v podmínkách *in vitro*. Byly založeny experimenty, u kterých byly sledovány změny v procesu tvorby hlíz vlivem rozdílné délky kultivace na indukčním médiu se sníženým obsahem anorganického dusíku. Byla stanovena kritická délka pro indukci tuberizace v podmínkách *in vitro*. Byl stanoven obsah fytohormonů a dusíku, které mají vliv na indukci a průběh tuberizace. Byly připraveny mikroskopické preparáty zachycující přeměnu stolonu v hlízu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Tuberizace

Tuberizace u brambor je sezónní, morfogenetický proces přeměny stonku v zásobní hlízu. Hlíza je metamorfovaný stonek. Jedná se o komplexní proces zahrnující anatomické, hormonální a biochemické změny vedoucí k diferenciaci laterálních stonků, stolonů a hlíz (HAJIREZAEI et al. 2000). Tuberizace probíhá v několika fázích: stolonizace, inhibice růstu stolonů, indukce a iniciace růstu hlíz. VREUGDENHIL a STRUIK (1989) popsali čtyři nezbytné kroky pro tvorbu hlíz na rostlinách bramboru. Prvním krokem je iniciace tvorby stolonu z axilárního pupenu. Za druhé se jedná o růst a větvení stolonu. Ve třetí fázi dochází k zastavení longitudinálního růstu stolonu. Posledním a tedy čtvrtým krokem je indukce a iniciace tvorby hlíz lilku bramboru. Proces tuberizace se sleduje zejména v *in vitro* podmínkách, kde dochází k větší frekvenci tvorby hlíz oproti polním podmínkám (FERNIE a WILLMITZER 2001). Iniciace tuberizace je doprovázena morfologickými a biochemickými změnami. Změny v růstu jsou zapříčiněny změnami hladiny hormonů (EWING 1995). Tento sezónní vývojový proces je ovlivňován celou řadou vnitřních a vnějších faktorů. Mezi indukující faktory patří nízká teplota, krátký den, nízký přísun dusíku, sacharidy a celá řada fytohormonů. Účinek jednotlivých fytohormonů se během tuberizace mění. Mezi faktory, které inhibují průběh tuberizace, patří dlouhý den, vysoká teplota a vysoký příjem dusíku. Mezi vnitřní faktory indukující tuberizaci patří obsah fytohormonů, zejména kyselina abcisová, kyselina indolyl-3-octová, etylén, kyselina jasmonová a cytokininy, dále pak sacharóza. Z vnějších faktorů se jedná o teplotu, fotoperiodu a minerální výživu dusíkem. Tuberizace se skládá ze tří vývojových kroků za prvé z indukce hlíz, za druhé z iniciace hlíz a za třetí z růstu hlíz (EWING a STRUIK 1992). Podle některých autorů, např. VREUGDENHIL a STRUIK (1989) ve své práci uvádějí, že jsou čtyři fáze tuberizace, zatímco v novější publikaci EWING a STRUIK uvádějí, že jsou pouze tři fáze tuberizace. Tuberizace brambor je vysoce komplexní proces regulovaný i přítomností sacharózy – zdroj uhlíku v médiu (ALTINDAL a KARADOGAN 2010). GREGORY a LE (1956) stolonu jsou podzemní výhonky lilku bramboru, které rostou šikmo nebo vodorovně. Vrcholy těchto stonků se metamorfuje v zásobní hlízy. Tvorba stolonů začíná hned po klíčení, často ještě dříve, než se objeví nadzemní část.

Mikropropagace brambor *in vitro* je významným postupem pro produkci hlíz. Mikrohlízy jsou první generace bramborové sadby získané v podmínkách *in vitro*, řešící problém převodu z *in vitro* do *ex vitro*. Mají možnosti využití pro snadné uskladnění, transport a mechanizaci pro jejich malou velikost a malou hmotnost. Proces produkce sadby je redukován na 3-4 roky (NISTOR et al. 2010). Meristémové kultury poskytují reproduktivní a ekonomické metody pro produkci viruprosté sadby (NISTOR et al. 2010). S produkcí sadby brambor jsou spojeny dva problémy. Prvním z nich je nízký výnos sadby. A druhým problémem je hrozba virových, houbových a bakteriálních nemocí při vegetativním množení sadby. Existuje korelační vliv velikosti hlíz na růst nadzemní části a také listů. Platí, že větší hlízy způsobují větší růst listů a nadzemní části a růst hlíz. Produkce zdravých hlíz je stěžejním problémem produkce brambor v mnoha zemích. Patrné je to při vhodné mikropropagaci a produkci hlíz. Hlavním problémem je vysoká cena (KAWAKAMI a IWANA 2012). Rychlý produkční systém zahrnuje čtyři fáze podle TADESSE et al. (2001):

- 1) *in vitro* multiplikace
- 2) aklimace
- 3) normalizace použijí se jednonodální segmenty, které se nechají zakořenit
- 4) produkce hlíz

3.2 Vnitřní faktory tvorby hlíz na tuberizaci

Jedná se o endogenní faktory tuberizace, především o různé fytohormony. Tyto vnitřní faktory přenášejí informaci/signál od vnějších faktorů a do jisté míry na nich závisejí a jsou jimi ovlivňovány.

3.2.1 Hormonální regulace tvorby hlíz

Fytohormony představují významný endogenní faktor tuberizace. Fytohormony zahajují přeměnu stolonu v zásobní hlízu, pokračují působením v jejím růstu a po čase vyvolávají její dormanci, tzn. že zabraňují předčasnému rašení pupenů a růstu nadzemní části. Hormony se mohou syntetizovat buď přímo v hlíze nebo mohou být do ní transportovány z okolních pletiv, orgánů. Analýza těchto hormonálních signálů je poměrně náročná a doposud komplexně nevysvětlená. Proces hormonální regulace se ještě komplikuje tím, že transportními cestami může být floém, xylém, apoplast nebo symplast (BANGERTH 2008).

3.2.2 Účinek auxinů

Auxiny patří mezi významné fytohormony, které hrají významnou roli při tuberizaci lilku bramboru, kde ovlivňují téměř každou fázi životního cyklu. Nejvyšší koncentrace auxinu je především v místech jeho syntézy, jedná se o primární meristém především vzrostného vrcholu a mladé listy. Odtud je signál přenášen bazipetálně na místo spotřeby (LOMAX et al. 1995). Bazipetální transport auxinů je polární a udržuje polaritu mezi buňkami v pletivech, ale i orgánů. Polární transport se vyznačuje významným morfogenetickým účinkem a je potřeba pro výstup specifických proteinových přenašečů tzv. PIN proteinů a AUX proteinů pro vstup auxinu do buňky (BLAKESLEE et al. 2005). Auxiny působí antagonisticky proti účinku cytokininů. Podporují apikální dominanci a brzdí růst axilárních pupenů. Potlačují růst primárního kořene a zároveň podporují růst bočních a adventivních kořenů. IAA podporuje růst kořene a tvorbu hlíz a současně brzdí růst stonku. Auxiny nemají vliv na počet založených hlíz, ale ovlivňují jejich velikost (ROMANOV et al. 2000). Auxin hraje významnou roli během tvorby hlíz. Hladina auxinů se dramaticky zvýší ve stolonech před začátkem tuberizace a zůstává relativně vysoká při následném růstu hlíz, což naznačuje podporovací vliv auxinu na tvorbu hlíz (ROUMELIOTIS et al. 2012). Auxin mění orientaci meristému z laterálního na longitudinální. Výsledkem je terminace elongace stonku a radiální ztloustnutí stolonu. Zvýšená koncentrace auxinů ve stolonu může podporovat dělení a expanzi buněk. Změna buněčného dělení souvisí zejména s poklesem obsahu GA. Proto rozdíl mezi obsahem GA a IAA může hrát roli v indukci tvorby hlíz (KLOOSTERMAN a BACHEM 2014).

3.2.3 Účinek giberelinů

Vnější faktory jako teplota, obsah dusíku, fotoperioda a obsah sacharózy v médiu mohou ovlivňovat endogenní hladinu fytohormonů v rostlině. Hladina endogenních giberelinů (GA) je zvýšená za neindukčních podmínek, a naopak za indukčních podmínek tuberizace se jejich hladina snižuje (VREUGDENHIL a SERGEEVA 1999). Prodlužování stonku je spojeno s intenzivním růstem, což vede k nedostatečné tvorbě mechanických pletiv. Růst kořenů je zpravidla potlačen. Dále se GA účastní procesů stimujících klíčení semen a oddalujících senescenci. Bylo provedeno detailní srovnání obsahu GA ve vrcholech stolonů a ve vyvíjejících se hlízách. Výsledky ukazují, že vyšší obsah endogenních GA je v rostoucích stolonech, zatímco před viditelnou iniciací hlízy byl obsah silně redukován (XU et al. 1998). V rostlinách bramboru je vyšší hladina GA za neindukčních podmínek. Pokud ošetříme celou rostlinu GA, dojde k inhibici tuberizace.

zace. Tuberizaci můžeme podpořit, pokud aplikujeme supresory a inhibitory činnosti GA. Existuje 120 různých GA pouze GA₃ je aktivní, působí v raných fázích tvorby hlíz, kde inhibuje indukci hlíz při tuberizaci. Obsah GA ve vrcholech stolonů v průběhu tuberizace klesá. Exogenní aplikace GA vede u lilku bramboru k potlačení tuberizace, a tedy k intenzivnějšímu růstu stolonů (ROUMELIOTIS et al. 2012). Řada vývojových změn u rostlin je způsobena změnou fotoperiody. Bylo zjištěno, že GA působí jako sekundární poslové v procesech vyvolaných dlouhou fotoperiodou. Indukce stolonů probíhá za dlouhého dne, zatímco indukce tvorby hlíz je vyvolána krátkým dnem. Pokud budeme aplikovat GA, můžeme zabránit tuberizaci. Indukce tuberizace je vyvolána nízkou hladinou GA v rostlině. K potlačení tuberizace dochází za podmínek dlouhého dne a za současného vysokého obsahu GA v rostlině (DRAGICEVIC et al. 2008). Exogenní aplikace GA zlepšuje tvorbu stolonu, ale negativně ovlivňuje indukci tuberizace. Ošetření hlíz GA způsobilo snížení dormance (COLEMAN et al. 2001). GA má silný inhibiční efekt a způsobuje degradaci aktivní GA ve vrcholech stolonů. Přítomnost GA hraje roli v různých fázích tvorby bramborových hlíz. Transgenní rostliny se sníženou expresí StGA2ox1, vedly k normálnímu růstu a opožděné tuberizaci *in vitro*. Bylo uvedeno, že úloha StGA2ox1 na začátku tvorby hlíz úpravou hladiny GA v subapikální oblasti stolonu usnadňuje normální vývoj a růst hlíz (KLOOSTERMAN et al. 2007). Bylo potvrzeno, že patrně téměř všechny GA tuberizaci inhibují, ale na druhou stranu MARKAROV (1990) zjistil, že tuberizace se může vyskytnout i po ošetření gibereliny, ale je opožděná a hlízy jsou menší a na rostlině jich vznikne méně. GA působí v raných fázích tvorby hlíz, podílejí se na elongaci stonku a stolonu. GA hrají roli ve změně meristémové identity a reorientaci buněčného dělení (ROUMELIOTIS et al. 2012). U fytochromu B vykazují deficitní rostliny zvýšenou hladinu GA nebo citlivost. Bylo zjištěno, že hlízy jsou protáhlé a obsahují nedostatečné množství chlorofylu (JACKSON a PRAT 1996).

3.2.4 Účinek cytokininů

Cytokiny (CK) jsou syntetizovány zejména v apikálních meristémech a kořenech, kde probíhá intenzivní buněčné dělení a odtud jsou rozváděny do cílových rostlinných pletiv. Exogenní aplikace CK má vliv na formování stolonů při tuberizaci a také má vliv na větvení stolonů (ROUMELIOTIS et al. 2012). Ke stejným závěrům došel také RASPOR et al. (2012), který tvrdí, že CK jsou syntetizovány převážně v kořenech zejména v apikálních meristémech, odkud jsou rozváděny do ostatních částí rostliny.

Méně jsou potom syntetizovány v mladých plodech, embryích a mladých listech. Vyšší obsah endogenních CK obsahuje kořen oproti stonku, převážně v inaktivní formě. Stanovení CK pomocí hmotnostní spektrometrie, ukázala, že hladina zeatin ribosidu je v indukčních podmínkách vyšší oproti neindukčním podmínkám. Ošetření jednonodálních segmentů zeatin ribosidem vede k tuberizaci (MAUK a LANGILLE 1978). Vyšší koncentrace BA (benzyl adenin) vede k vyšší frekvenci tvorby hlíz. Bylo zjištěno, že koncentrace 5 mg/l BA vede k nejvyšší tvorbě hlíz, a naopak nejnižší počet hlíz vznikl při koncentraci 1 mg/l BA. Obsah BA má vliv na čerstvou hmotnost hlíz – platí, že při vyšší koncentraci BA jsou hlízy větší a naopak (EBADI a IRANBAKSHI 2011). CK se účastní tvorby hlíz. Hrají roli v buněčném dělení, rozdělení asimilátů, akumulaci škrobu a signálních drahách fytohormonů, čímž ovlivňují vznik hlíz. Poměr cytokininů a auxinů má vliv na buněčné dělení, proto lze předpokládat, že to má podobný vliv i na tvorbu hlíz (KLOOSTERMAN a BACHEM 2014). BA inhibuje růst kořenů u jednonodálních segmentů lilku bramboru. Interakci mezi CK a JA snižoval celkový obsah cukrů v hlízách (SARKAR et al. 2006). Přídavek BA do média má vliv na pokročilou tvorbu hlíz a bylo pokusem prokázáno, že hlízy se objeví o 10 – 20 dní dříve, než u kontroly (GALIS et al. 1995). Růst stolonů na médiu s kinetinem vede k tvorbě hlíz oproti médiu bez kinetinu, to se hlízy netvoří. Kinetin eliminuje potřebu indukce fotoperiody k tvorbě hlíz u rostlin bramboru, což dokazuje stejný sklon k tuberizaci, jako u rostlin vystavených krátkému dni (FORSLINE a LANGILLE 1976).

Použití exogenních CK nebo zvýšená produkce CK v rostlinných pletivech vede k oddálení senescence listů, a tím se prodlouží fotosyntetická produkce. CK stimuluje transport živin do listů z jiných částí rostliny. Regulace syntézy fotosyntetických pigmentů a bílkovin je ovlivněna světlem a minerální výživou v kombinaci s CK. Aplikace CK pozitivně působí na indukci tvorby hlíz a hromadění škrobu v rostoucích stolonech. Vyšší koncentrace CK byla zjištěna ve špičkách stolonů a v rostoucích hlízách (DIMALLA a VAN STADEN 1977).

3.2.5 Účinek kyseliny abscisové

Bylo zjištěno, že ke zvýšené syntéze ABA dochází za předpokladu, že je rostlina či její části vystaveny stresu, jako je sucho, chlad, zasolení, poranění a infekce. Ke hromadění ABA v rostlinných pletivech dochází za podmínky, když je rostlina vystavena stresu suchem. Nízká hodnota vodního potenciálu směřuje k prudkému nárůstu ABA

v kořeni a současně nastává inhibice prodlužování stonku a prodlužování primárního kořene (SAAB et al. 1990). Ke snižování vodního potenciálu dochází v souvislosti se stoupající koncentrací sacharózy a iontů v médiu. Nízký vodní potenciál negativně ovlivňuje délku stonku, čerstvou hmotnost listů, počet kořenů, což je spjato i počtem vzniklých hlíz (GOPAL et al. 2008). Xylémem případně floémem probíhá transport a distribuce ABA do všech částí rostliny. ABA je primárně transportována do listů, kde se účastní zavírání průduchů. Během vývoje stolonu a hlízy dochází k poklesu obsahu ABA v rostlině (XU et al. 1998). Při pěstování brambor v médiu, které obsahovalo pouze sacharózu a kyselinu abscisovou, docházelo se zvyšováním její koncentrace v médiu ke zvyšování počtu nově založených hlíz. Bylo pozorováno, že tyto hlízy se bez dodání ostatních fytohormonů jen nepatrně zvětšovaly. To ukazuje na to, že kyselina abscisová má úlohu v založení hlíz a jejich růst již příliš neovlivňuje (KODA a OKAZAWA 1983). Endogenní gibereliny a kyselina abscisová byly identifikovány a kvantifikovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a plynovou chromatografií – hmotnostní spektrometrií. Bylo zjištěno, že GA podporuje prodlužování stolonu a inhibuje tvorbu hlíz, ale v případě ABA je to naopak. ABA podporuje tuberizaci a omezuje prodlužování stolonu. Endogenní hladina ABA klesá v průběhu stolonizace a vývoje hlíz. Úroveň kyseliny abscisové je srovnatelná v indukujících i neindukujících podmínkách (XU et al. 1998).

3.2.6 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová (JA) je zapojená do iniciace tuberizace u lilku bramboru. Podpora či inhibice tuberizace se odvíjí od dávky aplikované JA (ROUMELIOTIS et al. 2012). Bylo prokázáno, že kyselina jasmonová podporuje tuberizaci, přičemž tato stimulace je silnější u raných odrůd bramboru a s délkou vegetace schopnost tvorby hlíz slábne (KODA et al. 1991). Bylo zjištěno, že koncentrace JA s účinkem na tuberizaci je 20x vyšší než v případě kinetinu (cytokinin). JA je syntetizována v listech pod indukčními podmínkami, dále je hydroxylována a je transportována do stolonů, kde se účastní spuštění tvorby hlíz jako kyselina tuberonová. Účinek JA a kinetinu se odvíjí od fyziologického věku rostliny. Kinetin a JA byly přidány do média, kde také kinetin kromě JA byl efektivním induktorem tuberizace (PELACHO a MINGOCASTEL 1991). Zároveň byl pozorován inhibiční vliv kyseliny jasmonové na růst stolonů při vyšších koncentracích (7,5 ÷ 10 μ M) u raných kultivarů. Po aplikaci kyseliny jasmonové nebyl pozorován žádný účinek na počet hlíz. U raných kultivarů podporovala tvorbu sušiny v hlízách.

Kyselina jasmonová zvyšuje obsah redukujících a celkových cukrů v hlízách včetně obsahu škrobu (SARKAR et al. 2006). U jamů z čeledi smedincovitých, jedná se o jedlé škrobnaté hlízy podobné bramboru, bylo pozorováno, že hladina endogenní JA se v listech s postupným růstem zvyšuje a z toho vyplývá, že JA vyvolává růst hlíz. JA byla izolována z listů a identifikována pomocí HPLC a hmotnostní spektrometrie (KODA a KIKUTA 1991). JA vykazuje indukující aktivitu u tuberizace rostlin lilku bramboru, která je zahájena expanzí buněk. Disky bramboru kultivovány na médiu s JA vedly k bobtnání disků po jednom dni v kultuře a do pěti dnů se jejich hmotnost zdvojnásobila. Bylo potvrzeno, že kyselina jasmonová a methylester kyseliny jasmonové se podílejí a vyvolávají indukci hlíz (TAKAHASHI et al. 1994). Obsah ribosidů a 9-glukosidů cytokininů je ovlivněn přítomností nebo nepřítomností kyseliny jasmonové. Ošetření rostlinek bramboru JA vedlo k rozšíření kořenového systému, rozšíření listové plochy, navýšení počtu uzlin na stonku a zvětšení průměru stonku (DERMASTIA et al. 1994). Interakce JA s endogenní GA v meristému stolonu má vliv na tvorbu hlíz. JA je obsažena ve vysokých koncentracích v peridermu (ABDALA et al. 1996).

3.2.7 Etylén

Etylén při nižších dávkách tuberizaci podporuje, ale při vyšších dávkách dochází k inhibici potlačení účinku cytokininů a oxidu uhličitého. Nadbytek etylénu vede k tomu, že hlízy neobsahují téměř žádný škrob a jsou protáhlé. V důsledku vysokého obsahu etylénu v kultivačním médiu a nedostatečném obsahu oxidu uhličitého dochází k tvorbě světlých kalusů bez obsahu chlorofylu na bázi stolonů rostlin bramboru (MINGO-CASTEL et al. 1974). Etylén aplikovaný jako syntetický ethefon inhibuje etiolizaci axilárních výhonků a stimuluje radiální růst po celé délce výhonů. Stejně jevy nebyly pozorovány při aplikaci ACC – prekurzoru etylénu. Ethefon potlačil tvorbu hlíz. Dvojitá role etylénu v indukci tvorby hlíz měla pozitivní vliv tím, že blokuje prodloužení stolonů a potlačuje iniciaci hlíz (VREUGDENHIL a VAN DIJK 1989).

3.3 Vnější faktory na indukci tvorby hlíz

Vnější faktory tvorby hlíz lilku bramboru představují vlivy vnějšího prostředí, které tuberizaci buď stimulují, nebo naopak inhibují, účinky těchto vlivů se mohou sčítat nebo odčítat. Vnější faktory společně s aktivitou genů rostliny bramboru ovlivňují stav

a vývoj vnitřních faktorů tuberizace. Mezi vnější faktory patří teplota, fotoperioda, koncentrace sacharózy v médiu, minerální výživa, vlhkost a jiné.

3.3.1 Sacharóza

Cukr hraje roli v koordinaci a načasování vývojových procesů. Vysoká úroveň dostupného cukru způsobí tvorbu zásobních orgánů tedy hlíz (GIBSON 2005). V médiu probíhá interakce mezi dusíkem a sacharózou. Sacharóza má významný vliv na indukci hlíz při tuberizaci, nejmenší množství sacharózy vedoucí k tuberizaci je 2-3 % a optimální množství sacharózy v médiu je 8 % (NISTOR et al. 2010). Účinek indukce přetrvává určitou dobu, i když indukující podmínky už nejsou k dispozici. Sacharóza není určující morfogenní faktor na počátku vzniku hlíz (GREGORY 1956). V procesu tuberizace vysoká koncentrace sacharózy nepředstavuje zdroj energie, ale vyvolává indukční signál. Délka dne má rozhodující vliv na hladinu cukru při udržování signálu tuberizace (PERL et al. 1991). Apikální vrcholy stolonů tvořící hlízu akumulují škrob a sacharózu, ale obsah hexózy zejména fruktózy klesá. Ve vyvíjející hlíze je dvakrát více škrobu oproti ostatním částem rostliny lilku bramboru (ROSS et al. 1994). Při použití sacharózy a maltózy do média na indukci tuberizace brambor bylo sledováno, jak koncentrace těchto sacharidů ovlivňuje vznik hlíz. Nejvyšší celková hmotnost hlíz byla dosažena při koncentraci 4 % u maltózy a 10 % u sacharózy, přičemž optimální hlízy se tvořily při 4 % maltóze a 6 % sacharóze. Nízká a vysoká koncentrace sacharózy potlačuje začátek mikrotuberizace a vede k zisku méně hlíz (ALTINDAL a KARADOGAN 2010). Maximální katalytická aktivita invertázy (enzym katalyzující hydrolýzu sacharózy) a aktivita sacharóza syntázy spolu nepřímo koreluje. Během rané fáze tuberizace je aktivita invertázy vysoká a během maturace klesá, souvisí to s akumulací škrobu a uložením proteinů (HAJIREZAEI et al. 2000).

Sacharóza je významným asimilátem translokovaným do hlíz, při indukci hlíz apoplasticky a při jejich zvětšování symplasticky (FERNIE a WILLMITZER 2001). Sacharóza je ve vyvíjejících hlízách přeměňována na škrob, proto je nezbytné zajistit po celou dobu kultivace dostatečné množství sacharózy v médiu. Nižší množství sacharózy v médiu ovlivňuje pouze velikost hlíz, které jsou tvořeny až z 20 % škrobem. Syntéza škrobu je nezbytný proces pro růst hlíz (FERNIE a WILLMITZER 2001).

3.3.2 Fotoperioda

Tuberizace u lilku bramboru je silně ovlivňována délkou dne, přičemž platí, že krátké dny a dlouhé noci vznik hlíz stimulují a naopak dlouhé dny a krátké noci tento jev inhibují. MACHÁČKOVÁ et al. (1998) sledovali rostliny lilku bramboru po dobu dvou měsíců za různých podmínek. Jednalo se o tři varianty, část rostlin byla vystavena krátkému dni (14 hod. noc), druhá varianta zahrnovala rostliny vystavené krátkému dni, přičemž noc byla přerušena jednou hodinou světla a třetí varianta se týkala rostlin, které byly vystaveny kontinuálnímu světlu (dlouhý den). Rostliny z krátkého dne tvořily hlízy, zatímco rostliny z dlouhého dne kvetly, přestávka 1 hodinu potlačila tvorbu hlíz a vedla ke slabšímu kvetení. Změna fotoperiody může změnit indukované hladiny fytohormonů. Zatímco komerční odrůdy jsou poměrně necitlivé k délce dne, brambory volně žijících druhů *Solanum demissum* nebo *Solanum tuberosum* L. ssp. *antigena* jsou zcela závislé na fotoperiodě pro indukci hlíz. Tyto druhy tvoří hlízy jen za krátkých dnů. Na světle stabilní fytochrom PHYB je hlavní fotoreceptor podílející se na regulaci indukce tvorby hlíz (AMADOR et al. 2001). Molekulární mechanismy, které řídí tvorbu hlíz, byly podrobně zkoumány v posledních několika desetiletích. Protože ovlivňují vznik hlíz, počet a jejich velikost je pravděpodobně největší ekonomické omezení moderní produkce brambor. Byla odhalena přítomnost alely StSP6A, jejíž exprese je spojena s tvorbou hlíz za podmínek dlouhého dne (MORRIS et al. 2014). GARNER a BLAKE (1989) zjistili porovnáním tří délek dne, že zkrácená délka dne má pozitivní vliv na tuberizaci.

3.3.3 Teplota

Byl studován vliv kombinace délky osvitů a teploty na rostliny lilku bramboru. Vyšší teplota a delší fotoperioda oddálily růst hlíz a zvětšení objemu. Fotoperioda neovlivňuje absolutní rychlost růstu hlíz při nižších teplotách (VAN DAM et al. 1996). Vystavení zvýšené teplotě 30 °C/20 °C den/noc oproti 22 °C/16 °C den/noc vede ke snížení výnosu hlíz a nárůstu čistého výkonu fotosyntézy a snížení syntézy škrobu v hlízách. Výsledky ukazují, že mírně zvýšené teploty nezpůsobily klasické příznaky abiotického stresu a vývoj hlíz je odpovědí prostřednictvím na rozmanitost biochemických a molekulárních signálů (HANCOCK et al. 2014). Rostliny lilku bramboru byly vystaveny vysokým teplotám den 35 °C a noc 25 °C. Vysoké teploty během vegetačního období jsou příčinou řady změn v rostlinách bramboru, které ovlivňují jeho rozvoj a mohou vést k výraznému snížení ekonomického výnosu. Bylo zjištěno, že odpověď

bramboru na vystavení vysoké teplotě je závislá na fázi růstu. Čím dříve dojde k vystavení vysokým teplotám, tím je negativnější její dopad na růst a celkový výnos brambor (RYKACZEWSKA 2015).

3.3.4 Vliv minerální výživy

Příjem a distribuce N, P, K byly zkoumány pro jednotlivé fáze ontogeneze rostlin brambor. I když jsou dceřiné hlízy vytvořeny velmi rychle, tak je koncentrace N, P, K stabilní po dlouhou dobu. Tyto koncentrace jsou udržovány i přes klesající míry absorpce (MOORBY 1968). Existuje předpoklad, že nové odrůdy nebo agronomické postupy mají za následek snížení koncentrace minerálních látek nezbytných pro lidskou výživu u jedlých plodin. Bylo prokázáno, že koncentrace minerálních látek je snížena u genotypů poskytujících vyšší výnosy (WHITE et al. 2009). Význam dusíku je zejména v tom, že umožňuje rostlinám využít uhlík. Optimální zásobení rostlin dusíkem zvyšuje intenzitu růstu rostlin, což vede k větší listové ploše a tvoří se i větší hlízy (HASSANPANAHI et al. 2009). Vyšší příjem dusíku rostlinami se projevuje intenzivním vegetativním růstem a současně je potlačena generativní fáze tedy tvorba hlíz. Celkový počet hlíz a jejich hmotnost ovlivňuje genotyp, fotoperioda a obsah dusíku v médiu. Pokud jsou rostliny dobře zásobeny dusíkem, prodlužuje se období tuberizace *in vitro* (DOBRANSZKI a TABORI 2010).

Bylo zjištěno, že přidavek NPK hnojiva (komplexní hnojivo s obsahem dusíku, fosforu a draslíku) do média oproti kontrole (Murasige a Skoog médium) zvýšil *in vitro* tuberizaci. NPK mělo pozitivní vliv na všechny složky výnosu, jako je počet hlíz, hmotnost hlíz a hmotnost kořene a stonku (RADOUANI a LAUER 2015). Vysoká koncentrace draslíku vede k poškození vývoje hlíz *in vitro* po indukci. Využití jednonodálních segmentů ukázalo, že při vyšší koncentraci draslíku dojde k významnému snížení zelené biomasy s odpovídajícím poklesem obsahu škrobu v hlízách (SARKAR et al. 2010). Rostliny lilku bramboru byly pěstovány ve dvou variantách, v první se jednalo o snížený obsah dusíku v médiu a ve druhé variantě byl dostatek dusíku. Potlačení příjmu dusíku vedlo ke snížení růstu nadzemní části a vývoji mezofylu listu se zablokováním hromaděním chlorofylu (CHANG et al. 2016). Nitrátová forma dusíku podporuje produkci více silnějších stolonů a má za následek indukci tuberizace hlíz proti amonné formě. Nitrátová forma má vliv na ztlustění špičky stolonu nebo časnější produkci hlíz a jejich větší počet než při amonné formě (GAO et al. 2014).

3.3.5 Vliv vlhkosti

Lilek brambor je znám tím, že je mělce kořenící plodinou v polních podmínkách. Proto je náchylný na sucho a tedy vyžaduje pravidelné zavlažování oproti jiným plodinám (DURRANT et al. 1973). Brambory jsou plodinou, která negativně reaguje na změny v zásobování vodou. Do budoucna se uvažuje o plánovaném zavlažování podle evapotranspirace plodin a napětí vody v půdě. Na stresu vyvolaném suchem se podílí i to, že brambory jsou pěstovány na půdách s nižší zádržností vody (SHOCK et al. 2007). Z toho vyplývá, že stres suchem (i slabý) významně ovlivňuje rostliny bramboru a podepisuje se kvalitě i kvantitě bramborových hlíz. Snížená dostupnost živin při stresu nedostatkem vláhy ovlivňuje produkci brambor. Lilek brambor reaguje na účinky závlahy ještě před zahájením iniciace hlíz (SHOCK et al. 2007). Naopak i nadměrné zavlažování může ovlivnit kvalitu a kvantitu hlíz. Tyto hlízy jsou vodnaté a více trpí chorobami. Nadměrná závlaha vede také k vyplavování živin z půdy, což se negativně projeví na rostlinách lilku bramboru (SHOCK et al. 1993).

3.4 Chemické složení hlíz

Brambory jsou výborným zdrojem sacharidů, minerálních látek a vitaminů. Hlízy jsou složené převážně z vody, která tvoří 70-75 % a zbylé sušiny o obsahu 20-25 %. Uvedený obsah minerálních prvků vztažen na středně velkou hlízu s čerstvou hmotností 200 g, podle amerických kritérií. Doporučená denní dávka bramboru podle amerických kritérií obsahuje 26 % mědi, 17 % draslíku, 18 % fosforu a železa a 5 % až 13 % zinku, hořčíku a manganu (WHITE et al. 2009). U brambor je známo, že obsahují dostatek vápníku i sodíku. Brambory mohou být při správném hnojení významným zdrojem stopových prvků, jako je selen a jód. Selen je významný stopový prvek, jehož nedostatek vede ke zdravotním poruchám (BROADLEY et al. 2006).

Brambory se vyznačují významným obsahem minerálních látek, jejich obsah se odvíjí zejména od genotypu, prostředí, půdního typu a také od pH půdy. Na obsah minerálních látek působí obsah půdní organické hmoty, a také zavlažování a hnojení (NAVARE et al. 2014).

Aplikace minerálních hnojiv má vliv na koncentraci minerálů v hlízách. V závislosti na složení minerálních hnojiv dochází k interakcím mezi jejich jednotlivými složkami. Hnojení minerálními prvky může ovlivnit určité množství prvků v hlíze. Zvýšení výno-

su, a to buď aplikací minerálních hnojiv nebo rostoucí úrodností půdy, vede k poklesu koncentrace minerálních prvků v hlízách. Kromě aplikace hnojiv ovlivňuje složení hlíz také genotyp (WHITE et al. 2009). Hlízy lilku bramboru hned po vodě obsahují v největším množství škrob. Ten představuje 70 až 80 % sušiny. Škrob je tvořený amylopektinem a amylózou, které jsou obvykle v poměru 3:1 (WOOLFE a POATS 1987). Škrob má široké využití v průmyslu. V České republice převládá škrob vyrobený z brambor (60 %) a pšenice (40 %). Ve světě je nejvíce produkován kukuřičný škrob. Poměr amylózy a amylopektinu určuje, k čemu bude škrob dále využit, jestli v potravinářství nebo v lihovarnickém průmyslu. V potravinářství se upřednostňují odrůdy s vyšším obsahem amylózy a v průmyslu jsou používány odrůdy s vyšším zastoupením amylopektinu (ŠIMKOVÁ et al. 2013).

Obsah bílkovin v bramborových hlízách není příliš vysoký, pohybuje se mezi 1,7 – 2,1 g na 100 g čerstvé hmotnosti, což představuje zhruba 2 %. Brambory sice nepatří mezi potraviny s významným obsahem bílkovin, avšak v oblastech s vysokou spotřebou bramboru na jednoho obyvatele mohou mít vyšší nutriční využitelnost (STOREY et al. 2007).

3.5 Dormance hlíz

Dormance je považována za období vegetačního klidu. Při dormanci dochází ke zpomalení a zastavení vývojových a metabolických procesů hlíz. Toto období slouží především k překonání nepříznivých podmínek prostředí, ve kterém se rostliny lilku bramboru nacházejí. Období klidu se vyskytuje u nejmenších jednobuněčných organismů, až po organismy mnohobuněčné. Dormance je vyvolána působením vnitřních, ale i vnějších faktorů a v neposlední řadě je dormance ovlivněna geneticky. U rostlin a hlíz v mírném pásmu se jedná zejména o ochranu proti chladu a mrazu, kdy vystavení těmto podmínkám by bylo pro ně letální nikoliv pro semena.

Dormance je komplexní proces závislý na genetickém pozadí, vývojové fázi hlíz, environmentálních i řízených podmínkách v průběhu růstu a uskladnění hlíz. Teplota, zásobení vodou, zásobení půdy živinami a fotoperioda během růstu jsou důležité environmentální faktory regulující klíčení (MUTHONI et al. 2014). Ke stejným závěrům došla i AKSENOVA et al. (2013), která tvrdí, že dormance je komplexní proces závislý na odrůdě, růstové fázi hlíz, prostředí, a na celkových podmínkách během růstu

a uskladnění hlíz. Rozlišujeme tři typy dormance: endodormance, paradormance, ekodormance. Endodormance znamená ovlivnění vnitřními faktory vyplývající ze struktury a nastává hned po vytvoření hlízy. Rašení pupenů je v této fázi potlačené. Paradormance zahrnuje působení vnějších fyziologických faktorů. Vyznačuje se rašením jediného apikálního pupenu, který inhibuje ostatní meristémové pupeny a právě ty se nacházejí v paradormanci. Ekodormance je ovlivnění nepříznivými vnějšími faktory životního prostředí, především vlivem velmi nízkých teplot. V této fázi by hlízy za příznivých podmínek už mohly začít rašit (SUTTLE 2007). U planých druhů převládá delší období dormance oproti kulturním druhům. Dormance se ztrácí, když je teplota před nebo po sklizni vysoká, ale neplatí to obecně. Přítomnost nebo absence světla po uložení po sklizni má malý vliv na trvání dormance, ale dramatický vliv na morfogenezi vznikajících klíčků (SUTTLE 2007). Posklizňový průběh dormance je delší u malých (mladých) hlíz oproti velkým (starším) hlízám (SUTTLE 2007).

3.5.1 Dormance a skladování hlíz

Dormancí hlíz se myslí období potlačeného růstu pupenů v podmínkách vhodných pro růst (SONNEWALD 2001). Délka dormance hlíz jednotlivých druhů a kultivarů je poměrně variabilní, může trvat od 0 do více jak 9 měsíců. Většina kultivarů pěstovaných pro průmyslové využití má poměrně krátké období vegetačního klidu. Pokud chceme hlízy skladovat dlouhodobě, je nezbytné použití chemických látek, které podpoří dormanci a zabrání předčasnému klíčení. Dormance hlíz je ovlivněna genotypem a faktory vnějšího prostředí (SUTTLE 2007).

V mnohých studiích se délka dormance odvozuje od data sběru hlíz. V polních podmínkách se datum sběru může značně lišit a závisí na mnoha faktorech. Může se jednat o faktory, jako je vliv počasí, doba výsadby a agrotechniky (SUTTLE 2007). Termín sběru, jako výchozí bod pro měření délky dormance, nemá fyziologický význam. Uvádí se, že nejlogičtějším fyziologickým nebo biochemickým obdobím, od kterého by se měl měřit začátek dormance, je období začátku iniciace hlíz. Z toho vyplývá, že období vegetačního klidu uvažované od iniciace hlíz, by mohlo být ovlivněno faktory životního prostředí, které mají vliv na nadzemní část rostliny v průběhu růstu. Jako výchozí bod pro počátek dormance se může také brát ukončení růstu hlíz (CLAASSENS a VREUGDENHIL 2000).

Dormance umožňuje delší skladování zásobních orgánů, tedy hlíz. Správné skladování je nezbytné pro udržení kvality a životaschopnosti sadbových hlíz (BETHKE 2014). Protože jsou brambory pěstované na celém světě, je jejich skladování ovlivněno také produkční oblastí. Způsob uskladnění brambor závisí na požadované délce skladování, na místních podmínkách životního prostředí a od požadované kvality hlíz na konci skladování (BETHKE 2014).

Zkrácení délky dormance je nezbytné pro rychlou produkci sadbového materiálu a experimentální záměry. Prodloužení dormance je prospěšné pro prodloužení nabídky brambor na trhu. Předčasné rašení hlíz není vhodné ani při pěstování brambor v malém rozsahu, např. na zahrádkách či záhumencích. Rašením se u hlíz snižuje jejich nutriční hodnota a zvyšuje se obsah redukujících cukrů. Hlavním zájmem průmyslu je potlačení předčasného rašení hlíz (HAINES et al. 2003). Od způsobu skladování a délky dormance se odvíjí kvalita hlíz (sadby), kterou chceme využít v dalším roce. Z mikrohlíz se ve skleníku produkují minihlízy a ty se následně používají v polních podmínkách. Pro svoje rozměry, lehkou manipulaci a jednoduché skladování se mikrohlízy hojně využívají při studiu regulace dormance.

Dormance je vysoce regulovaná fáze vývoje, která je nezbytná pro přežití rostlin. Správný průběh aktivního růstu, který přechází do dormance a je následovaným pučením. Tento proces se týká všech pletiv hlíz, a proto je vyžadována fyziologická koordinace. Vývojové fáze rostlin jsou závislé na působení růstových regulátorů nebo fytohormonů (SUTTLE 2007).

Délka dormance je pod genetickou a environmentální kontrolou. Teplota, zdroj vody a fotoperioda v průběhu růstu a uskladnění, jsou důležité environmentální faktory regulující klíčení. Prodloužení dormantního období dosáhneme vystavením nízkým teplotám při skladování hlíz nebo použitím růstových inhibitorů. Gibereliny a cytokininy podporují rašení, zatímco kyselina abscisová a etylén inhibují růst výhonků. Obsah ABA v hlízách po sklizni je vysoký, musí klesnout pod určitou hranici, aby mohlo dojít k indukci růstu výhonů. Problém je, že nízké teploty způsobují degradaci škrobu a redukujících sacharidů. Toto snižuje jejich kvalitu, zejména pokud jsou určeny pro průmyslové využití. Zkrátit období dormance můžeme různými způsoby např. skladováním v ochranné atmosféře s nízkou koncentrací kyslíku nebo ošetřením chemickými látkami, které zkracují délku dormance (SONNEWALD 2001).

3.5.2 Vliv vnitřních faktorů na průběh dormance

Během vegetačního klidu se mění obsah fytohormonů v dormantních hlízách. Proto jejich interakce hrají úlohu při regulaci dormance. Vnitřní faktory zahrnují vliv mnohých genů. Interakce vnitřních faktorů se závisí na daném genotypu. Mezi hlavní fytohormony ovlivňující průběh dormance patří cytokininy, auxiny, gibereliny, kyselina abscisová a etylén. Z dalších se mohou účastnit kyselina jasmonová a fenolické sloučeniny. Různé fytohormony jsou syntetizované na více místech rostlin a nejsou tak striktně specifické, jako živočišné hormony, a proto se jich na vyvolání dormance může účastnit více.

3.5.3 Vliv auxinů na dormanci hlíz

Auxiny patří mezi významné fytohormony podporující růst. Jejich úloha v dormanci a rašení pupenů hlíz není příliš jasná. SORCE et al. (1996) zjistili pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, že koncentrace auxinu (IAA i konjugovaných forem) byla obecně nejvyšší v raných fázích dormance, tedy hned po sběru. Čerstvě posbírané hlízy akumulují auxin převážně v apikálním meristému, v axilárních pupenech a ve vodivých pletivech, které leží pod apikálním meristémem. Výraznější úrovně auxinů vykazovaly axilární pupeny na konci dormance především hladinami m-RNA transkriptů kódující enzymy související se syntézou auxinů. Hladina auxinů vzrůstá na začátku raných fází růstu pupenů. Dojde k aktivaci několika primárních genů pro syntézu auxinů a také genů pro PIN1 proteiny, které realizují jejich polární transport (HARTMAN et al. 2011). Pokud dodáme exogenně syntetické auxiny (2,4-D, NAA), dojde k výraznější inhibici růstu pupenů a prodloužení období dormance (SUTTLE 2003). Auxiny mohou mírně působit na zkrácení období vegetačního klidu, a to stimulací dřívějších růstových procesů v závislosti na kultivaru (SORCE et al. 2009). O endogenních auxinech nemůžeme říct, že patří mezi významné regulátory dormance hlíz. Jejich úloha je především v následné regulaci růstových procesů.

3.5.4 Vliv cytokininů na dormanci hlíz

CK jsou účinnými regulátory vegetačního klidu hlíz. Usnadňují přechod z dormance a podporují následný aktivní růst pupenů. Ve spících hlízách je nízký obsah bioaktivních CK. Následné vystoupení hlíz z dormance a začátek rašení souvisí se zvyšováním obsahu aktivních CK (KODA 1982). K podobnému výsledku došli také TURNBULL a HANKE (1985). Po dobu hlubokého vegetačního klidu byl obsah CK v hlízách nízký. Postupně se obsah CK v hlízách zvyšoval a nejvyšší hodnoty bylo dosaženo před raše-

ním a v období rašení pupenů. Konečná fáze dormance byla spojena se zvýšeným obsahem CK v hlízách a také zvýšením citlivosti na CK. Pokud použijeme přírodní a syntetický CK na dormantní hlízy, nastane přerušení období vegetačního klidu, což vede k rašení mnoha pupenů (HEMBERG 1970).

Bylo zjištěno, že syntetické deriváty CK, fenylnmočovina nebo nitroguanidin, byly účinnější v přerušení vegetačního klidu mikrohlíz oproti nativním. To by mohlo souviset s vyšší odolností syntetických CK vůči enzymatické degradaci (SUTTLE 2008). Exogenní aplikace CK nemá žádný vliv na dormantní hlízy, které jsou ošetřeny bezprostředně po sběru a na počátku období skladování a dormance. (SUTTLE 2001). Po určitém čase dormantní hlízy vykazují postupný nárůst citlivosti na CK. Nadále vzrůstá citlivost po dobu skladování a dormance, tak může být oslabena vlivem exogenně dodaných CK. Změny v účinnosti CK po období dormance nejsou výsledkem jejich katabolismu, ale spíše hormonální citlivosti nebo transdukce signálu (SUTTLE 2001). Klíčová úloha endogenních CK v období dormance byla potvrzena na rostlinách transgenního lilku brambor, které měly zabudovaný gen CKX pro tvorbu cytokinoxidázy/dehydrogenázy. Tyto hlízy vykazovaly zvýšenou expresi a syntézu enzymu, která je zodpovědná za inaktivaci CK. Účinek tohoto genu spočíval v tom, že měl za následek opoždění rašení a růst pupenů o 5 až 8 týdnů. Ošetření těchto hlíz pomocí BA se obnovil normální průběh dormance a rašení hlíz. Naopak transgenní hlízy se zvýšenou biosyntézou CK mají výrazně zkrácenou dobu vegetačního klidu (HARTMAN 2011).

3.5.5 Vliv gibberelinů na dormanci hlízy

BRIAN et al. (1955) zjistili mezi prvními, že aplikace GA vede ke zkrácení dormance. RAPPAPORT et al. (1958) uvedli, že aplikace GA ve formě postřiku na nať před sběrem hlíz vedla ke dřívějšímu rašení hlíz. Ošetření dormantních hlíz GA podporuje předčasné rašení hlíz a tento postup byl schválený pro komerční použití a běžně se používá (CLAASSENS a VREUGDENHIL 2000). GA₃ je účinný při zkrácení období klidu hlíz, ale jeho účinnost závisí na kultivaru. Klíčky vyrůstající z pupenů ošetřených hlíz, mají sklon být dlouhé, tenké, křehké a všeobecně náchylné k poškození při manipulaci a zejména při výsadbě. Tento negativní jev můžeme omezit komerčním použitím GA₃ (SALIMI 2010).

Obsah endogenních GA jako jsou GA₁₉, GA₂₀, GA₁ je poměrně vysoký ihned po sklizni. Obsah klesá po dobu skladování a nejvyšších hodnot dosahuje v období sil-

ného růstu (SUTTLE 2004). Bylo zjištěno, že v době prvotního rašení vnitřní hladiny některých zkoumaných GA byly nižší, jako ty u hlíz v hluboké dormanci. U trpasličích mutantů brambor bylo zjištěno, že obsahovaly detekovatelné množství GA₁. Navzdory tomuto zjištění byl jejich vývoj srovnatelný v jednotlivých fázích vegetačního klidu jako u normálního fenotypu. Umělé snížení obsahu endogenního GA₂₀ a GA₁ metodou antisense na expresi genu *StGA20ox1*, který je odpovědný za biosyntézu GA, neovlivňovalo trvání dormance, ale opožďovalo následný růst výhonů (CARRERA et al. 2000). Stimulace předčasného pučení se dá dosáhnout použitím různých inhibitorů biosyntézy GA (SUTTLE 2004).

Transgenní rostliny se sníženým obsahem endogenních CK neodpovídaly na ošetření pomocí exogenně aplikované GA₃. Na základě tohoto pokusu se došlo k závěru, že GA vyžadují přítomnost CK na indukci rašení hlíz a CK jsou nezbytné pro vyvolání dormance. Transgenní rostliny nesoucí gen pro *insoentenyl transferázu*, který vede ke zvýšení endogenního obsahu CK, podporovaly gibberelinu zprostředkované rašení hlíz *in vitro* (HARTMAN 2011). Přirozeně se vyskytující endogenní GA nehrají významnou roli v regulaci dormance, spíše podporují následný růst výhonů. K ukončení dormance může vést zvýšení endogenních GA. Na zkrácení dormance má vliv exogenní aplikace GA. Jednotlivé odrůdy mohou reagovat odlišně, je to způsobeno hloubkou a dobou trvání dormance.

3.5.6 Vliv kyseliny abscisové na dormanci

ABA je významným a hlavním hormonálním regulátorem dormance. Je potřebná jak pro vyvolání dormance, tak pro její průběh. Bylo zjištěno, že obsah ABA v pupenech a parenchymu se zvýšil po nástupu vegetačního klidu. Nejvyšší obsah dosahovala po dobu hluboké dormance a výrazně klesala na konci vegetačního klidu (SUTTLE 1995). Pokud uměle přerušíme dormanci, dojde k poklesu ABA v hlízách (SUTTLE 2007). Předčasné vystoupení z dormance bylo způsobeno umělým snížením obsahu ABA pomocí inhibitoru ABA biosyntézy FLD (SUTTLE 1995). Po 9 týdnech růstu byly hlízy sklizeny a uloženy po dobu následujících 15 až 20 týdnů (SUTTLE a HULTSTRAND 1994). Dlouhodobé působení FLD po dobu dormance mělo vliv na předčasné rašení po 3 až 6 týdnech kultivace. Aplikace ABA na hlízy ošetřené FLD obnovila endogenní obsah ABA a potlačila rašení hlíz. Mimochodem, použití FLD na hlízy

v hluboké dormanci vede také k předčasnému rašení hlíz (SUTTLE a HULTSTRAND 1994).

Na délku trvání klidu hlíz nemá žádný vliv trvalé zvýšení endogenního obsahu ABA. Ačkoliv pokles obsahu ABA koresponduje s průběhem vegetačního klidu v hlízách, je patrné, že není nevyhnutelným předpokladem pro ukončení dormance (SUTTLE 2012). Úloha ABA je významná v iniciaci a udržování dormantního stavu hlíz. Její úloha je méně jasná při ukončení dormance a následném rašení hlíz. Zatím ještě nebylo zjištěno, jestli existuje nějaká prahová koncentrace ABA pro ukončení dormance (SUTTLE 1995). Ukončení dormance je způsobeno kombinací několika faktorů. Na dobu vegetačního klidu nemá vliv ani trvalé zvýšení obsahu ABA (SUTTLE et al. 2012).

3.5.7 Vliv etylénu na dormanci hlíz

Bylo zjištěno, že etylén stimuluje počátek dormance. Ale bohužel jeho úloha v tomto a následných procesech není příliš objasněná. Účinky exogenně dodávaného etylénu se odvíjí od kultivaru a délky ošetření. RYLSKI et al. (1974) dokázali, že 72 hodinové ošetření etylénem způsobilo zkrácení délky dormance, ale došlo k potlačení růstu pupenů při kontinuální expozici. Snížení koncentrace etylénu po dobu skladování prodloužilo dobu trvání dormance a vedlo k poklesu celkového množství pupenů po 35 dnech (WILLS et al. 2004).

Produkce etylénu byla nejvyšší na počátku dormance a potom prudce klesala (SUTTLE 1998). Na počátku dormance může dojít k přechodnému zvýšení etylénu, které může být způsobeno namáháním a poškozením pletiva v souvislosti se sběrem (SUTTLE 2007). Použití dusičnanu stříbrného (AgNO_3) nebo 2,5-norbornadienu, které vedou k inhibici účinku etylénu, vede k předčasnému rašení hlíz. Použití exogenně aplikovaného etylénu na takto ošetřené hlízy inhibovalo předčasné rašení (SUTTLE 1998). Bylo dokázáno, že endogenní etylén je významný v indukci dormance hlíz a přímo vyvolává endodormanci mikrohlíz (SUTTLE 1998). Délka dormance může být do určité míry ovlivněna exogenní aplikací etylénu. Jeho účinek se odvíjí od kultivaru, délky expozice a kultivačních podmínek.

3.6 Vliv vnějších faktorů na dormanci

3.6.1 Vliv teploty na dormanci hlíz

Podmínky počasí před sběrem a po sběru mohou mít účinek na dormanci hlíz. Pokud budeme skladovat brambory přibližně po dobu jednoho měsíce při teplotě těsně pod bodem mrazu (-1 °C), může dojít k prodloužení dormance nebo se může trvale narušit schopnost hlíz rašit (BURTON 1978). Dormanci může ovlivnit také počasí v průběhu sezóny, zejména krátce před sklizní. Studený a vlhký průběh sezóny před sklizní, vede k prodloužení dormance zhruba o měsíc. Na druhou stranu suché, a teplé počasí snižuje dormanci zhruba o 9 týdnů (BURTON 1978).

Vystavení hlíz vysokým teplotám vede k jevu označovanému jako tepelné rašení nebo rašení při vysoké teplotě. Vysoká teplota 32 °C v závislosti na kultivaru vedla k rašení hlíz a také na ně působila negativně. Negativní vliv vysoké teploty se projevoval hnědnutím pupenů a ztrátou životaschopnosti. Ke zkrácení dormance o 2 až 3 týdny, u všech kultivarů dojde po skladování při teplotě 28 °C a následné přemístění do teploty 18 °C. Také vystavení chladným teplotám 2 °C a následné přemístění do 18 °C vedlo ke zkrácení období vegetačního klidu přibližně o 2 týdny (VAN ITTERSUM a SCHOLTE 1992).

Po určité době mohou nízké teploty napomáhat hlízám z výstupu z dormance. Po překonání endodormance jsou hlízy vlivem chladu udržovány v ekodormanci. Nízká teplota pravděpodobně působí na snížení koncentrace růstových inhibitorů. Rašení hlíz je vyrovnanější a rychlejší u těch hlíz, které jsou přeneseny z chladu do indukčních podmínek. Dlouhodobější vystavení nízkým nebo vysokým teplotám má za následek ukončení dormance, po přenesení do mírných podmínek nastane rychlé rašení.

3.6.2 Vliv světla a sacharózy na dormanci hlíz

Dormance může být ovlivňována již po dobu tuberizace a následného rozvoje hlíz. COLEMAN a COLEMAN (2000) zjistili, že při skladování hlíz při 8 h fotoperiodě oproti kontinuální tmě došlo k výraznému snížení období dormance. Doba zkrácení se odvíjela od kultivaru. K účinnějšímu zkrácení dormance došlo po přidání sacharózy do indukčního média v kombinaci s 8 h fotoperiodou. Vyšší koncentrace sacharózy v indukčním médiu (12-16 %) zkracovala dormanci, jak při 8 h světla, tak za kontinuální tmy. Na druhou stranu nižší koncentrace sacharózy (4 %) má vliv na prodloužení období klidu (COLEMAN a COLEMAN 2000). Vliv světla na zkrácení dormance se odvíjí zejména od jednotlivých genotypů. Případně teplota, koncentrace sacharózy nebo

fytohormony ve spojení s fotoperiodou krátkého dne, mohou zvýšit účinek světla na zkrácení dormance. V průběhu skladování má přítomnost nebo nepřítomnost světla jen malý vliv na období dormance, ale významně ovlivňuje morfologii vznikajících pupenů (SUTTLE 2007).

3.7 Sadba brambor

Pro produkci brambor se zpravidla užívají hlízy jako sadba. Pokud se jedná o hlízy o průměru větším než 25 mm, pak se jedná o konvenční sadbu hlíz. Nicméně v posledních letech se používají pro produkci sadby tzv. minihlízy, které byly odvozeny z rostlin *in vitro*. Tyto minihlízy se používají v prvních fázích množení sadby brambor. Kromě toho se v omezeném množství používá bramborových semen. Sadba brambor je produkována všude tam, kde se brambory pěstují. Často se používají malé hlízy, které mají špatnou kvalitu. Dobrá kvalita sadby je zaručena pěstováním, přesně za tímto účelem. Bramborové hlízy musejí projít certifikací a musí být pěstovány na půdách prostých chorob. A v průběhu vegetace sadbových brambor musí být sledovaný výskyt chorob a škůdců. U brambor je poměrně vysoká degenerace původně zdravého osiva. Při pěstování ze semen a následném klonovém výběru trvá 8–10 roků, než vznikne certifikovaná sadba. V mnoha zemích nejsou pro produkci sadby odpovídající rostlinolékařské podmínky, a tedy není možné po tak dlouhou dobu udržet sadbu zdravou. V takových zemích se používá rychlé namnožení sadby za 3–4 roky. Sadba brambor by měla být prostá karanténních chorob, jako je kroužkovitost a hnědá hniloba. Nové rychlé množící techniky pro výrobu minihlíz jsou založeny na explantátových kulturách, k tomu se využívá např. hydroponie. Tyto techniky umožňují produkci velkého množství hlíz v krátkém čase. Minihlízy mají zpravidla průměr 5 – 20 mm a hmotnost 0,5–5 g. Za předpokladu, že původní rostlinný materiál byl zdravotně nezávadný včetně latentních chorob, pak můžeme tyto hlízy použít jako pre-základní sadbu.

3.8 Certifikace sadby brambor

V ČR se v současné době využívá pro novošlechtění odrůd bezvirového materiálu, který lze získat ozdravením napadeného materiálu pomocí meristémových kultur v podmínkách *in vitro*. Na novošlechtění navazuje bezvirové udržovací šlechtění taktéž v podmínkách *in vitro*. Ke kontrole bezvirového stavu rostlinného materiálu se využívají metody ELISA a PCR. Tímto postupem je možné dosáhnout zkrácení cyklu udr-

žovaciho šlechtění a produkce sadby o 2–3 roky (HORÁČKOVÁ et al. 2008). Metoda ELISA se hojně využívá pro hodnocení zdravotního stavu rostlin, u brambor zpravidla v kombinaci s negativním výběrem.

U sadby brambor je důležité používat certifikovanou sadbu z důvodu výskytu virových chorob. Součástí uznávacího řízení množitelského porostu je i kontrola zdravotního stavu na výskyt virových chorob tzv. ELISA testem. Z důvodu zajištění minimálního napadení virovými chorobami se smí sadba brambor množit jen v tzv. uzavřených pěstebních oblastech. Jedná se zpravidla o vyšší polohy, kde je předpoklad nižšího výskytu přenašečů virových chorob a všechny porosty včetně konzumních zde mohou být pěstovány pouze z certifikované sadby. Pokud je k výsadbě použita vlastní sadba, dochází zpravidla k rychlému výskytu viróz a silnému snižování výnosu. Po dvou až třech přesadbách, zejména v teplejších oblastech, bývá většinou celý porost silně napadený s předpokladem velmi nízkého výnosu. V mnoha případech sklizeň není vůbec rentabilní a dochází k likvidaci porostu. Použitím certifikované sadby je zajištěn odpovídající zdravotní stav a tudíž i podmínka dosažení vysokého výnosu.

3.8.1 Požadavky na množitelské porosty a sadbu brambor

Rozlišujeme několik kategorií sadby brambor. Odlišujeme rozmnožovací materiál předstupňů SE 1 a SE 2, dále tři stupně základní E 1, E 2 a E 3, potom následuje certifikovaný rostlinný materiál A a B *obr. č. 1 a obr. č. 2*. Sadbu lze vyrábět v kategorii B pouze za předpokladu, že použitý výchozí rozmnožovací materiál obsahuje nejvýše 5 % hlíz napadených viry, při použití ELISA diagnostiky. Platí, že musíme splnit několik požadavků na vlastnosti množitelských porostů. Před výsadbou musí být na pozemku proveden průzkum na výskyt *Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida* s negativním výsledkem. Pozemek nesmí být v karanténě z důvodu předešlého výskytu háďátek *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* a *Ralstonia solanacearum*, které se týkají zákazu množení sadby. Množení na stejném pozemku je přípustné nejdříve za tři roky po předchozím porostu brambor. Musí být dodrženy minimální izolační vzdálenosti množitelských porostů od jiných porostů brambor s výskytem virových chorob nad 10 %. Každý množitelský porost musí být zřetelně oddělen od sousedního porostu alespoň jedním, bramborami neosázeným řádkem, nebo nejméně 10 m dlouhým neosázeným pruhem v šíři sazeče na počátku i na konci množitelského porostu. Za nedodržení minimální vzdálenosti množitelských porostů od jiných porostů brambor se považují i vy-

selektované rostliny neodstraněné v den následující po selekci. Zdravotní stav porostu se hodnotí pomocí přehlídek porostu a prováděním negativních výběrů (odstranění napadených rostlin a plevelných brambor). U každého stupně sadby brambor musí být dodržena velikost hlíz pro jednotlivé kategorie, velikost hlíz je uvedena v zákoně. Pokud máme sadbu, tak velikost sadbových brambor může obsahovat max. 3 % podsadbových brambor a 3 % nadsadbových brambor. Velikost sadby se stanovuje na čtvercových sítích o minimálním rozměru 35 x 35 mm a maximálním rozměru 60 x 60 mm. V jedné partii sadby musí být zastoupeny hlízy všech velikostí ve vyrovnaném poměru. Příměs zeminy a jiných nečistot může být nanejvýš 2 %. Hlízy jiných odrůd nejvýš 0,1 %. Nesmí obsahovat škodlivé organismy, které je zakázáno zavlékat a rozšiřovat na území EU. Dále se hodnotí výskyt suché a mokré hniloby, plíseň brambor, aktinomycetová obecná strupovitost bramboru, vložkovitost hlíz bramboru. Při produkci sadby se také hodnotí vnější vady způsobené mechanicky nebo škůdci, hlízy poškozené mrazem nebo zapařením. Hodnotí se také silné šednutí až černání dužniny zaujímající více než 1/3 hlízy a silná rzivost dužniny více jak 1/10 hlízy.

Při pěstování brambor na sadbu musíme dodržovat celou řadu pokynů, které vycházejí z vyhlášky č. 369/2009 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu. Musí být dodržena kvalita a zdravotní stav množitelského materiálu, mohou být použity hlízy získané z explantátových kultur. V průběhu sezóny musí být porost pravidelně kontrolován pracovníkem UKZUZ a musí být prováděny negativní výběry, aby se snížil výskyt napadených a plevelných rostlin bramboru. Přehlídky porostů se provádějí třikrát za sezónu, při průměrné výšce trsů 20 cm, v plné vegetaci a po ukončení vegetace. Takto získaná sadba musí být zabalena a označena návěškou: úřední návěška sadby brambor – rozmnožovací materiál předstupňů nebo šlechtitelský rozmnožovací materiál obsahuje několik důležitých údajů, jako např. triviální a botanický název druhu, označení kategorie množení a název odrůdy.

používají vícenodální segmenty s více pupeny nebo malé hlízy do velikosti 3 mm (DONNELLY et al. 2003). Hlavní nevýhodou produkce sadby v podmínkách *in vitro* ve srovnání s produkcí sadby v polních podmínkách jsou nepochybně její vyšší finanční náklady. Problém představuje nižší výnos a menší velikost hlíz (GOPAL et al. 2008). Cílem komerční produkce sadby je zajistit optimální podmínky produkci velkého množství sadby odpovídajícího zdravotního stavu a velikosti. Během kultivace *in vitro* jsou rostliny vystaveny nestandardním podmínkám. Rostliny jsou pěstované v uzavřené vzduchotěsné nádobě za zvýšené relativní vlhkosti vzduchu, důvodem je zabránění vzniku mikrobiální kontaminace. Takto získané rostliny jsou velmi citlivé a vyžadují několik týdnů aklimace (BAROJA-FERNÁNDEZ et al. 2002). Zavedení explantátových kultur do produkce sadby brambor mělo velký vliv zejména na zkrácení doby produkce sadby. Tímto způsobem lze získat dostatečné množství sadbových brambor a vysoké úrovně zdravotnosti materiálu. Byly porovnány rostliny získané v *in vitro* podmínkách, mikrohlízy a hlízy získané z normálních polních podmínek. Tyto rostliny byly vysázeny na pole a byla u nich sledována náchylnost na virové onemocnění. Bylo zjištěno, že sadba získaná v podmínkách *in vitro* vykazuje vyšší náchylnost k virovým chorobám (WROBEL 2014). Byla porovnávána produkce hlíz z několika variant sadby z rostlin *in vitro*, mikrohlíz, minihlíz a tradičních sadbových brambor. Všechny tyto varianty byly vysázeny na pole ve třech termínech (2. týden v dubnu, 4. týden v dubnu a přelom června a července). Nejvyšší koeficient produkce hlíz byl u tradiční sadby a mikrohlíz, a naopak nejnižší u minihlíz. Co se týká mikrohlíz získaných z rostlin *in vitro*, tak tam byla největší produkce ve třetím termínu. Obecně platilo, že vyšší produkce hlíz byla u všech variant u třetího termínu výsadby (WROBEL 2015).

Vysoká produkce hlíz byla vyvinuta s pomocí automatizovaného systému bioreaktoru. Používají se bioreaktory rotační nebo stacionární, ve kterých je umístěno tekuté médium, které se podle potřeby může měnit. Kultivace explantátů probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku byly donorové rostliny inokulovány do bioreaktoru pro růst a množení rostlin. V druhém kroku po čtyřech týdnech kultivace se médium vymění za nové a dojde k indukci a iniciaci hlíz. Analýza velikosti hlíz ukázala, že přidavek BA v kultivačním médiu pozitivně ovlivnil formování hlíz, které byly velké až 1,1 g (PIAO et al. 2003). Porovnáním pěstování brambor v bedýnkách, květináčích a hydroponii vyšlo najevo, že nejvhodnější pro pěstování sadby brambor se jeví hydroponie. Mezi výhody hydroponie

patří jednoduchá sklizeň, řízená minerální výživa, efektivnější využívání vody a nižší spotřeba pesticidů. V případě hydroponie byl výnos výrazně vyšší oproti zbylým variantám (CORREA et al. 2008). RITTER et al. 2001 porovnávaly produkci hlíz mezi pěstováním pomocí aeroponie a hydroponie ve skleníku. U aeroponie byl pozorován intenzivní vegetativní růst a opožděná tuberizace v porovnání s hydroponií. Pěstování bez půdy má mnoho výhod v porovnání s pěstováním v půdě, které se hojně využívá. Jedná se o vyšší produkci, řízenou minerální výživu, nižší napadení chorobami a škůdci. RYKACZEWSKA (2016) ve své studii zjistila, že při využití aeroponie dosáhne 2–3x vyšší výnosy v produkci minihlíz ve srovnání s tradičními metodami. Dále výsledky této studie ukázaly, že aeroponický systém je dobrou technologickou alternativou pro produkci bramborové sadby, a že odrůda hraje významnou roli v počtu vytvořených hlíz.

3.8.3 Výzkumné ústavy zabývající se šlechtěním, produkcí a udržováním sadby brambor

V České republice má šlechtění a množení brambor dlouhou tradici. Brambory byly k nám dovezeny během třicetileté války v letech 1636 – 1638. Pěstování brambor se u nás nejprve omezovalo na pěstování na šlechtických sídlech a klášterních zahradách. Jejich pěstování později pomáhalo lidem překonat období moru, hladu a jiných epidemií při neúrodě obilnin, a to zejména po napoleonských válkách. V 18. století a na začátku století 19. zaznamenaly největší rozvoj brambory na škrob, výrobu lihu a na krmení. Ve světě začali pomalu vznikat četné šlechtitelské stanice, zejména v Anglii, Německu a Americe. Vlastní základ šlechtění byl vyvolán rozsáhlými škodami způsobenými plísní bramboru. Ze strachu o ztrátu sadby se začaly brambory pěstovat ze semene. První odrůdy vznikaly samoopylením a až později se přešlo ke křížení dvou odrůd. První stanicí na území České republiky byla stanice ve Valečově u Německého Brodu, dnes Havlíčkův Brod. Odrůdy už v té době byly rozděleny na konzumní, průmyslové a krmné a podle ranosti se dělily na rané, polopozdní a pozdní. Postupně dochází k družstevně organizovanému pěstování brambor, a to vedlo k založení odborných pracovišť. V roce 1921 ve Valečově vznikla Státní výzkumná stanice zemědělská. O dva roky později vzniká v Německém Brodě Státní výzkumný ústav bramborářský. A také v roce 1923 vznikla v Keřkově šlechtitelská stanice.

V současné době se novošlechtěním bramboru zabývají v České republice zejména SATIVA Keřkov, SELEKTA Pacov, VESA Velhartice a částečně i Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod. Tyto společnosti byly až do roku 1990 součástí jednoho státního podniku Oseva Praha. Tvorba odrůd na jednotlivých pracovištích byla úzce specializovaná. Současná SATIVA se zabývala šlechtěním brambor s krátkou vegetační dobou, dnešní SELEKTA především tvorbou odrůd s vysokým obsahem škrobu a VESA se zabývala experimentálním šlechtěním a přípravou výchozích materiálů s vyšší odolností vůči chorobám a škůdcům. Stanice Keřkov se jako první naše šlechtitelská stanice začala zabývat šlechtěním brambor na rezistenci proti hád'átku bramborovému v roce 1967 a v roce 1986 byla vyšlechtěna na této stanici odrůda Klára odolná vůči hád'átku bramborovému. Příkladem pracoviště zabývajících se šlechtěním a produkcí sadby brambor je šlechtitelská stanice VESA Velhartice. V současné době jsou jako základ využívány pouze zcela zdravé rostliny z explantátových kultur pěstované v technickém izolátu. Takto získané hlízy jsou dále rozmnožovány v prostorovém izolátu a následně přihlašovány k množitel'skému cyklu jako super elita (SE). Takto získaná sadba je dále množena u smluvních partnerů.

V tomto období nebyly odrůdy českého šlechtění vystaveny příliš silné konkurenci. Šlechtění bylo především zaměřeno na odolnost odrůd vůči chorobám jako je plíseň bramboru a aktinobakteriální obecná strupovitost a škůdcům, jako je hád'átko bramborové. V první polovině devadesátých let minulého století došlo k významnému rozšíření sortimentu u nás povolených a pěstovaných odrůd. V současné době mohou být u nás pěstované odrůdy registrované v ČR (142 odrůd z toho 52 českých) a odrůdy registrované v ostatních státech EU (Společný katalog odrůd druhů zemědělských plodin, který uvádí více jak 1500 odrůd).

Udržovací šlechtění brambor využívá k udržení vysoké kvality výchozích materiálů zejména explantátových kultur – meristémů. Je vybráno několik klonů u odrůdy. Ty jsou pečlivě sledovány a nejlepší využívány k produkci výchozích materiálů. Množitelský cyklus se zkrátil na minimální období. Od meristémových kultur k použití sadby na běžné ploše uplyne pouze 5 let. Tím se výrazně zvýšila kvalita nabízené sadby. Pečlivé sledování v průběhu množitel'ského cyklu a kvalitní selekce snižuje následně pěstitelská rizika zemědělců.

Historie Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě sahá hluboko do první poloviny dvacátého století. V naší republice patří k nejstarším výzkumným ústavům. VUBHB se zabývá udržováním genetických zdrojů bramboru v genové bance, šlechtěním a diagnostikou chorob a škůdců. Hlavní náplní práce ústavu v minulosti byla vědecko-výzkumná činnost, která pokrývala prakticky celou bramborářskou problematiku. Při řešení výzkumných problémů byla samozřejmostí spolupráce s tuzemskými institucemi, ale i spolupráce se zahraničními pracovišti. Součástí bylo rozsáhlé poradenství jak pro odbornou, tak laickou veřejnost. Vedle výzkumu a navazujících činností mnohem větší prostor musí mít aktivity, které přináší určité zdroje pro rozvoj ústavu. Jedná se především o zajištění tzv. registračních pokusů při zkoušení přípravků na ochranu rostlin, o skleníkové posklizňové zkoušky zdravotního stavu sadby (ELISA), o množení ozdravených odrůd a kříženců brambor metodou explantátových kultur.

Práce s genovým fondem bramboru má v VÚB dlouholetou tradici. Probíhá nepřetržitě již od roku 1952. Výzkumný ústav bramborářský je jediným pracovištěm v Česku, které se touto problematikou zabývá. V genové bance v Havlíčkově Brodě je na 2439 vzorků, které reprezentují 1258 odrůd *Solanum tuberosum*, 478 tetraploidních kříženců *Solanum tuberosum*, 271 dihaploidů, 313 genotypů od pěti kulturních a 23 planých druhů a 119 mezidruhových hybridů rodu *Solanum*. Součástí genové banky je rovněž kolekce 140 odrůd vyšlechtěných v Česku v letech 1932 – 2013. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi cenný materiál, je jeho bezpečné zachování jistěno uložením v kryobance bramboru, která byla vytvořena ve Výzkumném ústavu v Praze-Ruzyni. Kryobanka slouží ke konzervaci vegetativních vrcholů bramboru. Nejstarší české odrůdy jsou také duplicitně uloženy v podmínkách *in vitro* ve Velké Lomnici na Slovensku, v rámci reciproční spolupráce obou genových bank. Aby mohly být genetické zdroje brambor správně hodnoceny, zda jsou vůbec životaschopné, nestačí jen kultura *in vitro*. Je vysazována polní studijní kolekce na tzv. pracovní parcele. V polních podmínkách je ročně hodnoceno sto až sto padesát vzorků. Vzorky slouží k uchování genotypu a obnově již zapomenutých odrůd příkladem; je odrůda Keřkovských rohlíčků, které se podařilo zachránit pomocí meristémových kultur. Posláním banky genetických zdrojů bramboru je shromažďování a rozšiřování kolekce, dlouhodobé a spolehlivé uchování genofondu a jeho regenerace, systematické studium, hodnocení a charakterizace vzorků a dokumentace genetických zdrojů bramboru, mezinárodní

spolupráce v oblasti genetických zdrojů bramboru a poskytování informací o udržovaném materiálu. Vzorky z genové banky se na vyžádání poskytují pro výzkumné, šlechtitelské a vzdělávací programy v České republice, ale i v zahraničí. Vzorky jsou žadatelům poskytovány zpravidla ve formě rostlinek *in vitro* nebo minihlízek z produkce ve skleníku.

3.9 Analytika biologicky významných látek v procesu morfogeneze hlíz

Fytohormony můžeme stanovit dvěma způsoby, a to buď kvalitativně biotesty nebo kvantitativně instrumentálními a imunochemickými metodami. Biotesty se nehodí pro kvantifikaci, protože se používají pro ověření biologické účinnosti dané látky. Do instrumentálních metod řadíme plynovou chromatografii, vysokoúčinnou plynovou chromatografii, kapilární elektroforézu a řadu dalších metod. Imunochemické metody využívají ke stanovení fytohormonů protilátky (imunoglobuliny), jedná se o vysoce citlivé metody. Tyto metody jsou založeny na kompetici nativního či standardního fytohormonu (haptenu) a radioaktivně (RIA) nebo enzymově (ELISA) značeného fytohormonu (ligandu) ve vazbě na specifickou protilátku. Pro stanovení ABA se používá radioimunoanalýza (RIA) a stanovení CK pomocí HPLC v kombinaci s metodou ELISA.

3.9.1 Princip RIA při stanovení kyseliny abscisové

Radioimunoanalýza je imunochemická analytická metoda založená na principu kompetitivní reakce stanovovaného analytu a vhodného radioindikátoru o vazebná místa specifické protilátky. Principem imunochemické reakce je specifická reakce založená na kompetici haptenu (stanovovaný analyt) a značeného radioligandu (radioindikátor) o vazebná místa specifické protilátky. Současně platí, že množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu. Radioimunoanalýza (RIA), jedná se o vysoce citlivou kvantitativní imunochemickou metodu pro stanovení hledaného analytu v pg - ng. RIA ke stanovení ABA je založena na schopnosti monoklonální protilátky MAC 252 (QUARRIE et al. 1988) rozpoznat molekulu ABA s velmi vysokou specifitou bez nežádoucích křížových reakcí (BARRIEU a SIMONNEAU 2000). Základem metody je kompetitivní reakce při vazbě nativní nebo standardní ABA (haptenu) a radioaktivně značené ^3H -ABA (radioligandu) na molekulu protilátky MAC 252. Pokud je v reakci neměnné množství protilátky MAC 252 a ^3H -ABA a zároveň nadbytek nativní ABA (haptenu), tak dochází k vazbě haptenu s protilátkou a zároveň

dochází k vytěšňování radioligandu z vazby s protilátkou. Reakce bude probíhat tak dlouho, dokud se neustaví imunoprecipitační rovnováha. Optimální tvorby komplexů haptenu-protilátka a radioligand-protilátka je dosaženo za vystavení nízké teplotě (+4 °C). Oddělení volných radioligandů a haptenu od komplexů protilátek s haptenem nebo radioligandem je provedena vysrážením se síranem amonným a následnou centrifugací. ³H-aktivita sedimentu se zjišťuje technikou kapalné scintilace na scintilačním spektrofotometru PACKARD 2000 CA. Získané hodnoty jsou převedeny na obsah ABA v analytu v „pg“ prostřednictvím programu Securita PACKARD. Kalibrační křivka je sestavena za pomoci standardní ABA. Platí předpoklad, že použití konstantního množství protilátky vede k tomu, že množství značeného vázaného haptenu je nepřímo úměrné množství neznačeného haptenu ve vzorku. Pomocí standardů je možné vyjádřit vztah mezi množstvím neznačeného haptenu v komplexu haptenu-protilátka a původním množstvím haptenu ve vzorku kvantitativně. Výsledky koncentrace ABA v analytu v pg jsou převedeny na obsah ABA v gramu čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu v ng/g.

3. 9. 2 Princip ELISA při stanovení cytokininů

Izolované, purifikované extrakty rostlinného materiálu s cytokininy je nezbytné rozdělit pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) na jednotlivé frakce cytokininů. Tyto pak musí být kvantifikovány pomocí imunotestu (RIA, ELISA). Princip ELISA testu je podobný jako RIA (imunoprecipitace) a následující enzymatická reakce a spektrofotometrické hodnocení barevného produktu. Podobně jako u RIA může být ELISA uspořádána kompetitivně a kalibrační křivka vykazuje nepřímou úměru. Ke stanovení CK se používají polyklonální protilátky vůči jednotlivým frakcím cytokininů (STRNAD 1996).

3.10 Stanovení produkce etylénu, ethanu a CO₂ metodou plynové chromatografie

Stanovit přímo etylén je poměrně složité, protože se z rostlin uvolňuje také stresový etylén. Nádoba na měření etylénu pomocí plynové chromatografie musí mít co nejmenší objem, zároveň však musí umožňovat růstové pochody rostlin a bránit úniku plynů z nádoby do okolního prostředí (FIŠEROVÁ et al. 2008). Rostliny jsou proto kultivovány v typicky laboratorních nádobách nebo ve skleničkách od dětské výživy. Tyto nádoby mohou být uzavřeny pomocí víčka s plastovým septem (v tom případě, kdy potřeb-

bujeme plyny odebírat opakovaně) nebo latexovou membránou (v případě jednorázových odběrů). Pro odběr plynných vzorků se používá stříkačka (Braun Melsungen AG) její objem je 2 ml a jehla (Beeton Dickison Ltd., Irsko) její průměr je 0,5 mm. Před analýzou se objem vzorku upravuje na 1 ml. Protože je počet opakování a odběrů vysoký, není možné vzorky analyzovat okamžitě po jejich odběru v plynovém chromatografu. Před vyhodnocením jsou vzorky skladovány ve stříkačkách zapíchnutých jehlou do gumového špuntu (Vitrum Rožnov s. r. o.) z láhve. Plynné vzorky následně procházejí po rozdělení na koloně plamenově ionizujícím detektorem (FID, FISSONS INSTRUMENT, Itálie; součástí přístroje je i 50 m kapilární kolona Al_2O_3). Citlivost plynové chromatografie můžeme zvýšit, pokud místo běžného vzduchu použijeme čistý O_2 (THOMPSON 1977). Za předpokladu, že dodržíme výše uvedený metodický postup, lze změřit i nízké koncentrace etylénu.

3.11 Stanovení dusičnanových iontů v médiu za použití spektrofotometrie

Ke stanovení anorganického dusíku lze použít celou řadu jednoduchých metod, např. ke stanovení dusičnanových iontů se používají iontově selektivní elektrody, které jsou potenciometrickými senzory. Orientačně lze použít kolometrické metody s detekčními papírky (barevná detekce na stupnici koncentrace dusičnanových iontů) „Nitrate test“ firmy Merck. Pro stanovení amonných iontů lze využít spektrofotometrické stanovení pomocí Nesslerova činidla.

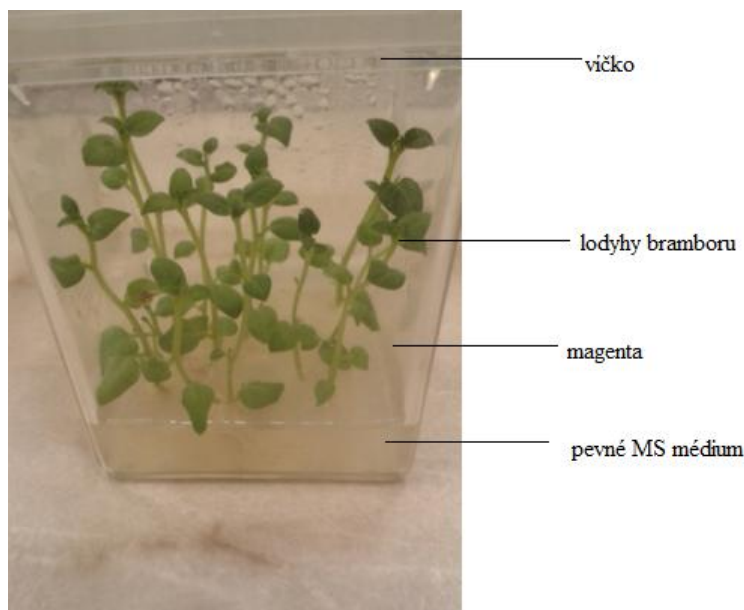
4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál a kultivace

K experimentům vedených v podmínkách *in vitro* byly použity rostliny lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) odrůdy Karin, která patří mezi velmi rané odrůdy, vhodná pro dlouhodobější skladování obr. č. 3. Materiál je dlouhodobě udržovaný na Ústavu biologie rostlin od roku 2000, kdy byl získán na základě žádosti z genové banky z Výzkumného ústavu bramborářského v Havlíčkově Brodě.

Rostliny lilku bramboru byly pěstovány v kultivačních nádobách typu Magenta GA-7. Na kultivaci bylo použito MS médium (MURASHIGE a SKOOG 1962) s přídavkem 30 g/l sacharózy a 8 g/l agaru a pH 5,8. Pasážování rostlin na udržení a rozmnožování kultury se provádělo dekapitací apexu a jeho přenesením na nové médium. Rostliny byly vystaveny 24 h nepřetržité kultivaci na světle $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při teplotě 22 °C.

Experiment byl založen ve flow-boxu ze sterilně předpěstovaných rostlin lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) tab. č. 1 do skleněných baněk po čtyřech jednonodálních segmentech. Pro tvorbu hlíz bylo použito modifikované MS médium se sníženým obsahem anorganického dusíku a s přídavkem BA (10 mg/l) a sacharózy (80 g/l). Standardní obsah dusíku je 43 μM , a ten byl snížen na 12 μM . Po přenesení jednonodálních segmentů na indukční médium byly umístěny v termostatu a vystaveny teplotě 19 °C a absolutní tmě po dobu tří dnů. Poté byly přeneseny do kultivační místnosti, kde byly umístěny pod umělé osvětlení $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ s délkou dne 8 hodin a teplotě 22 °C. Podle variant probíhal přenos jednonodálních segmentů z indukčního média se sníženým obsahem anorganického dusíku na MS médium vždy po uplynutí délky kultivace. Pravidelně od třetího týdne byl každý týden odvětráván etylén u všech variant včetně kontroly. Výjimku představoval pokus zaměřený na stanovení obsahu etylénu, kde se odvětrávání neprovádělo. Pokus zaměřený na sledování tvorby hlíz byl kultivován po dobu devíti týdnů, přičemž od 4. týdne byl zaznamenáván počet vytvořených hlíz, tedy po dobu pěti týdnů.



Obrázek č. 3 Kultura lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v podmínkách *in vitro*.

varianta	Indukční médium (délka indukce)	MS médium (délka subkultivace)
Varianta 1	1 týden	8 týdnů
Varianta 2	4 týdny	5 týdnů
Kontrola	9 týdnů	0 týdnů

Tabulka č. 1. Přehled založeného pokusu.

4.2 Média

Pro experiment byly použity dva druhy agarem ztuženého živného média. Pro vyvolání indukce tuberizace u jednonodálních segmentů lodyh bylo použito modifikované MS médium se sníženým obsahem 12 μmol anorganického dusíku v nitrátové formě s obsahem 10 mg/l BA tzv. indukční médium. Pro následnou subkultivaci bylo použito MS médium bez růstových regulátorů, které sloužilo pro následný růst a vývoj hlíz.

Základem indukčního média je MS médium s přidavkem 80 g/l sacharózy, 10 mg/l BA se sníženým obsahem anorganického dusíku na 12 μmol , 8 g/l agaru a pH 5,8.

4.3 Stanovení cytokininů

Byly odebrány vždy dva vzorky z každé varianty a z každého vzorku byla stanovena tři opakování pro stanovení endogenní hladiny CK. Vzorky byly pravidelně odebírány od začátku založení pokusu každý týden až do devátého týdne od založení pokusu pro každou skupinu explantátů s rozdílnou délkou indukce. Vzorky byly ukládány do mra-

zícího boxu. Stanovení CK vyžaduje několik kroků jako je extrakce, purifikace, stanovení pomocí HPLC a ELISA.

4.3.1 Extrakce, purifikace a HPLC separace CK

Po homogenizaci lyofizovaného rostlinného materiálu se pomocí Bieleskiho fixáže odstraní lipidy a lipofilní barviva (chlorofyl) centrifugací homogenátu při 2000 g (BIELESKI 1964). Cílem bylo dosáhnout oddělení supernatantu (vodný metanol) obsahující CK od chloroformu (obsahuje barviva, lipofilní látky aj.). Následovně byly vzorky čištěny podle MACHÁČKOVÁ et al. (1993).

Po odpaření metanolu do vodného zbytku následuje štěpení ribotidů CK kyselou fosfatázou v 0,04 M acetátamonném pufru o pH 6,5. Iontoměničová chromatografie za použití P- celulózy při pH 3,00 oddělí cytokininový extrakt od látek s negativním nábojem. CK a jejich ribosidy s parciálním nábojem kladným se byly zachyceny na P- celulóze a poté byly z kolony P- celulózy eluovány 0,2 M amoniakem. Po úpravě pH na 6,5 pokračovala purifikace jako chromatografie na reverzní fázi na DEAE-celulóze spojené s C18 kolonkou (Sep-Pak). CK se v tomto kroku čištění byly zachyceny na C18 sorbentu a po eluci přečištěné CK frakce metanolem se provedlo zkoncentrování vzorků odpařením metanolu. Poté byly vzorky rozpuštěny a před nástřikem na HPLC byly filtrovány.

HPLC separace byla provedena na přístroji firmy Ecom. Separace cytokininových bází a jejich ribosidů probíhala na koloně Nucloeosil 5 s C18 sorbentem s 250 x 4,6 µm I. D. s velikostí pórů 5 µm a průtokem mobilní fáze 1000 µl/min, se složením mobilní fáze A: metanol, B: 0,05 % TFA. Gradient mobilní fáze zahrnuje 0 – 3 min 15 % A, 3 – 11 min 40 % A, 11 – 16 min 60 % A. UV signál je detekován při 272 nm a jednotlivé frakce po sobě následujících CK se sbírají dle příslušných retenčních časů. Frakce se odpařují do sucha a pro ELISA kvantifikaci se rozpouští v TBS pufru (900 µl).

4.3.2 Postup ELISA stanovení

1. pipetování protilátky v uhličitanovém pufru (150 µl/jamka).
2. inkubace přes noc
3. 2x promytí desky studenou destilovanou vodou
4. pipetování 200 µl/l BSA do všech jamek

5. 2x promytí destilovanou vodou
6. pipetování TBS pufru, standardů, vzorků a traceru alkalické fosfatázy s ribosidem dané cytokininové báze
7. inkubace při laboratorní teplotě 1 hod.
8. 4x promytí TBS pufrem
9. pipetování substrátu PNPP v uhličitanovém pufru (150 μ l/l na jamku)
10. inkubace při laboratorní teplotě 1 hod.
11. zastavení enzymatické reakce přidáním 50 μ l/l 5M KOH
12. měření na spektrofotometru SUNRISE TECAN při 405 nm

4.4 Stanovení obsahu ABA metodou RIA

Pro stanovení obsahu ABA v jednodálčím segmentu lilku bramboru byl první odběr proveden po třech dnech od založení pokusu a potom každý týden od prvního týdne až do šestého týdne. Ve všech případech byl materiál odebrán ve dvou opakováních a následně uložen do mrazícího boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.1 Extrakce ABA z rostlinného materiálu

Vzorky pro stanovení ABA v rostlinném materiálu byly extrahovány do vody a uloženy po dobu 7 až 14 dnů do mrazícího boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Homogenizace se prováděla ve třetí misce vychlazené tekutým dusíkem (navážka do 1 g) pomocí mořského písku a desetinásobku destilované vody. Vzniklé extrakty byly po dobu 7 až 14 dnů uchovány v mrazícím boxu. Vzorky obsahující chlorofyl byly 2–3x rozmrazeny, aby došlo k vymražení chlorofylu jejich barviv aj. Následně byla provedena centrifugace vzorků po dobu 5 minut při 5000 otáčkách, mořský písek, vysokomolekulární látky (škroby, chlorofyly, bílkoviny), fragmenty rostlinného materiálu sedimentují, a naopak ABA zůstává v supernatantu.

4.4.2 Postup radioimunoanalýzy byl následující:

1. příprava standardů pro kalibrační křivku a vzorků do předem označených mikrozku-mavek
2. přidavek 100 μ l ^3H -ABA

3. přidavek 100 µl protilátky MAC
4. přidavek 200 µl 50% PBS
5. inkubace 45 minut v ledničce při teplotě 4 °C
6. přidavek 500 µl 100% (NH₄)₂SO₄
7. inkubace 30 minut při laboratorní teplotě, příprava centrifugace
8. centrifugace 10 minut při 12 500 ot/min a 4 °C
9. odstranění supernatantu odsávacíčkou
10. přidavek 1 ml 50% (NH₄)₂SO₄ , uzavření mikroskopické mikrokumavky
11. vortexování, tzn. roztřepání sraženiny
12. centrifugace cca 8 minut při 11 000 ot/min a 4 °C
13. odstranění supernatantu odsávacíčkou
14. přidavek 100 µl destilované H₂O, uzavření mikroskopické mikrokumavky
15. vortexování sraženiny
16. přidavek 1 ml dioxanového scintilátoru
17. pevné uzavření mikroskopické mikrokumavky, vložení do měřících ampulí, měření 3H - aktivity na scintilačním spektrofotometru Packard TRI-CARB 2900 TR
18. přepočítání hodnot 3H – aktivity na pg ABA dle programu Securia

4.5 Příprava trvalého mikroskopického preparátu

4.5.1 Příprava vzorků

Byly odebrány vzorky. Jako první vzorek byl vybrán jednodávný segment lodyhy lilku bramboru s axilárním pupenem. Odběr byl proveden hned po založení pokusu. Druhým vzorkem explantátů byly zvoleny segmenty s patrnou stolonizací. Vzorek byl odebrán ve druhém týdnu od založení pokusu. Třetím vzorkem byly segmenty, u kterých započala přeměna stolonu v hlízu. Hlíza byla ještě nepatrná. Tento vzorek byl odebrán ve třetím týdnu.

Na fixaci byla použita Navašinova fixáž (roztok A a B v poměru 1:1). Navašin A se skládá z Cr₂O₃ 1,5 g, ledové kyseliny octové 10 ml a destilované vody 90 ml. Navašin B

obsahuje 40 % vodný roztok formaldehydu 40 ml a destilovanou vodu 60 ml. Vzorky byly v Navašinově fixáži přes noc a potom probíhala 24 hod. vymývání fixáže pod tekoucí vodou.

Dehydratace probíhala vzestupnou etanolovou řadou 10, 30, 50, 70, 90% etanol 15 minut, 96, 96, 100, 100% etanol 45 minut. Převedení do xylenu: etanol+xylen 3:1, etanol + xylen 1:1, etanol + xylen 1:3, 100 % xylen, 100 % xylen vždy 60 minut.

Převedení do parafínu: přidání pevného parafínu (Paraplast Plus, Leica) ke vzorkům s xylenem, inkubace 12 hod. při pokojové teplotě, přidání roztaveného parafínu ke vzorkům, inkubace 12 hod. při 42 °C, přidání parafínu, inkubace 4 hod. při 58 °C, 2x postupná výměna ½ objemu parafínu, náhrada čistým parafínem, 4krát výměna celého objemu za čistý parafín, vždy po 12 hod. Umístění do zalévacích plastikových krabiček, inkubace při 60 °C. Vhodné polohování vzorků v krabičkách, rychlé zchlazení parafínu na ledu. Řezání vzorků: rotační mikrotom Leica RM 2255, tloušťka řezů 14 µm. Žehlení na vodní lázni, přenesení na podložní skla (Super Frost Plus, Thermo Scientific) a topné desce při t. 42 °C, vysušení.

4.5.2 Cajal-Brožkovo barvení (podle Němce *et al.* 1962):

Parafinové řezy na podložním skle odparafinujeme v xylenu (100 %) po dobu 20 min., poté inkubujeme ve směsi xylen: etanol (1:1) 10 minut a ve 100 % etanolu 10 minut. Rehydratujeme sestupnou etanolovou řadou 90, 70, 50, 30 a 10 % (v každém roztoku inkubujeme 5 min.), následně inkubujeme 10 minut v destilované vodě. Barvíme 15 minut v nasyceném vodném roztoku bazického fuchsinu, poté opláchneme v destilované vodě. Barvíme v roztoku pikroindigokarmínu 10 minut, opláchneme ve vodě okyselené kyselinou octovou. Diferenciuje v 80 % etanolu tak dlouho, až z řezů nevytéká červené barvivo. Přeneseme do 96 % etanolu a diferencujeme, dokud se řezy neobarví na modrozelený odstín (cca 1 min.). Rychle odvodníme (100 % etanol), projasníme a uzavřeme – akrylátové uzavírací médium Solakryl.

4.5.3 Pořízení mikrofotografií

Mikroskop Olympus IX70, pomocí fotoaparátu Olympus E450 s využitím software Quick Photo Micro 3.0.

4.6 Stanovení produkce etylenu, etanu a CO₂

Pokus na sledování změn v produkce etylenu, etanu a CO₂ byl založen do typicky laboratorních nádob s plastovým septem pro odběr plynů *obrázek č. 4*. U explantátů s týdenní indukcí byl proveden přenos explantátů na MS médium po jednom týdnu a u explantátů se čtyřtýdenní indukcí byl proveden přenos explantátů po čtyřech týdnech na MS médium. Explantáty s devítitýdenní indukcí byly po celou dobu měření na indukčním médiu. První odběr byl proveden po 24 hodinách od založení pokusu a potom byly další odběry provedeny 2. den, 4. den, 9. den, 11. den a poté každých sedm dní až do 39. dne. Co se týká produkce etylenu, tak nejvyšší byla naměřena u explantátů po devíti týdnech indukce v průběhu celého měření.



Obrázek č. 4 Experiment na stanovení etylenu, etanu a CO₂.

4.7 Stanovení amonného dusíku s Nesslerovým činidlem absorpční spektrofotometrií

4.7.1 Příprava vzorků

Vzorky jednodálních segmentů lodyh brambor byly homogenizovány ve třecí misce s přidavkem 5 ml destilované vody. Vzorky odebraného média byly taktéž homogenizovány s přidavkem 5 ml destilované vody. Zhomogenizované vzorky byly přelity do zkumavek a uloženy na noc do mrazícího boxu. Druhý den ráno byly vzorky rozmrazeny a následně byly zcentrifugovány při 4000 otáčkách po dobu pěti minut. Vzorky byly přelity do nových zkumavek, abychom se zbavili sedimentu.

4.7.2 Stanovení NH₄⁺

Byla připravena kalibrační řada. Do zkumavek bylo napipetováno 5 ml destilované vody, přidáme 0, 30, 75, 100, 150, 200 a 300 µl chloridu amonného. K tomuto roztoku

přidáme 200 µl Nesslerova činidla a 17, 5 µl vlnanu draselno-sodného. Příprava vzorků na stanovení amoniakálního dusíku probíhá tak, že do kyvety bylo napipetováno 2 ml vzorku, bylo přidáno 200 µl Nesslerova činidla a 17, 5 µl vlnanu draselno-sodného. Vzorky z kalibrační řady i vzorky rostlinného materiálu byly měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 425 nm.

4.7.3 Stanovení NO_3^-

Pro stanovení nitrátových iontů byl použit Nitrate test, který je založen na kolorimetrickém stanovení pomocí testovacích papírků. Do každého vzorku byl ponořen testovací papírek na 1 s a následně se čekalo jednu minutu, až se papírek zbarví podle koncentrace NO_3^- a poté se porovnal se stupnicí zabarvení. Intenzita zabarvení určovala koncentraci NO_3^- ve vzorku. Obsah nitrátových iontů se pohybuje v rozmezí 0 – 500 mg/l. Čím je tmavší zabarvení papírku, tím je vyšší koncentrace NO_3^- ve vzorku.

4.8 Statistika hodnocení

Pro jednotlivé skupiny explantátů v každém opakování byl vypočítán průměr, střední chyba a směrodatná odchylka. Pro konečný výsledek se průměrné hodnoty z jednotlivých opakování příslušných variant průměrovaly. Dále byla vypočtena průměrná hodnota frekvence tuberizace v procentech pro jednotlivé skupiny explantátů lišící se délkou kultivace na indukčním médiu, včetně směrodatné odchylky a střední chyby. Pro stanovení frekvence tuberizace byly provedeny čtyři opakování. Pro stanovení CK, ABA, dusíku, etylenu, etanu a CO_2 byly provedeny dvě opakování.

Bylo ověřeno, zda data mají normální rozdělení. Byl použit Shapiro-Wilkův test. Pro střední hodnoty vypočtené pro frekvenci tuberizace a stejně tak pro obsahy stanovených látek byla p-hodnota menší než 0,05, proto byla testovací hypotéza (H_0) zamítnuta. Platila tedy alternativní hypotéza (H_1), tzn. data nemají normální rozdělení. Byl proveden test pro ověření homogenity rozptylu, konkrétně Leveneův test homogenity rozptylů a následně Tukeyův test.

4.9 Fotodokumentace

Fotografická dokumentace byla pořízena pomocí digitálního fotoaparátu Olympus 410 EC.

5 VÝSLEDKY

5.1 Morfologické změny v průběhu tuberizace

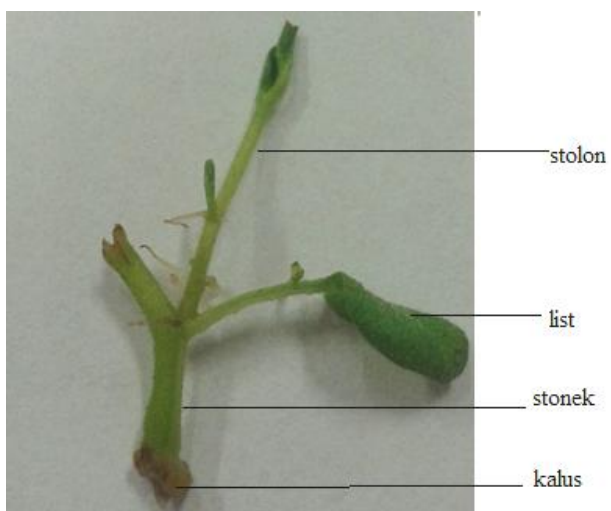
Na počátku kultivace jednonodálních segmentů lodyh lilku brambor *in vitro* obr. č. 5 a obr. č. 8 došlo v prvním týdnu k obnově porušené apikální dominance. To se projevilo horizontálním růstem úžlabního pupene ve stolon obr. č. 6 a obr. č. 9, který představuje kvalitativní proces uvolnění z korelativní růstové inhibice pupene. Stolonizace se projevovала dlouhivým růstem stonků bez větvení obr. č. 10. Po přenesení explantátů na MS médium pokračoval růst stolonů. Čím delší dobu trvala kultivace explantátů na indukčním médiu, tím bylo kratší období stolonizace. Stolonizace probíhala nejintenzivněji až do doby, než se začaly utvářet hlízy. Jakmile se začaly tvořit hlízy obr. č. 7 a obr. č. 11, nastala inhibice vegetativního růstu. Vrcholové internodium stolonu zastavilo růst, začalo se pozvolna zvětšovat a připomínat hlízu. Hlíza se postupně dále zvětšovala.

První hlízy se začaly objevovat od čtvrtého týdne od založení experimentu. Doba vzniku hlíz se významně lišila mezi jednotlivými variantami. Čím déle byly explantáty umístěny na indukčním médiu, tím dříve po přenesení na MS médium došlo k přeměně stolonů v hlízy. Na každém jednonodálním segmentu stonku se vytvořila buď jedna hlíza, nebo k přeměně stolonu v hlízu vůbec nedošlo. Pokud došlo k indukci a iniciaci růstu hlízy, tak se zcela zpomalil či zastavil růst laterální větve stonku. Kořeny se u explantátů netvořily na indukčním médiu ani po přednesení na MS médium. Na bazální řezné ploše stonku byl patrný kalus.

Hlízy byly nejčastěji dlouze oválné, žluté až světle zelené barvy. Velikost hlíz byla poměrně nevyrovnaná. Na hlízách byly patrné postranní pupeny označované jako očka, v některých případech došlo k jejich rašení. Hlízy byly buď zanořeny v médiu, nebo volně na stolonu mimo médium. Ke konci experimentu došlo v některých případech ke hnědnutí explantátů a usychání listů. Někdy došlo i k zasychání apikální části stolonu. Na stolonu se vyskytovalo pouze několik malých listů.



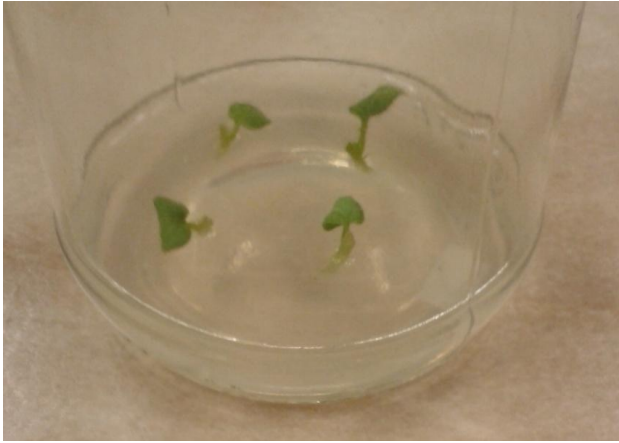
Obrázek č. 5 Jednonodální segment lodyhy lilku bramboru.



Obrázek č. 6 Stolonižace jednonodálních segmentů stonků lilku bramboru in vitro.



Obrázek č. 7 Tuberizace na stolonu lilku bramboru.



Obrázek č. 8 Založení kultury jednonodálních segmentů stonků pro produkci hlíz v podmínkách in vitro.



Obrázek č. 9 Počátek stolonizace (prorůstání axilárních pupenů ve stolony).



Obrázek č. 10 Patrná stolonizace a tvorba prvních hlíz.



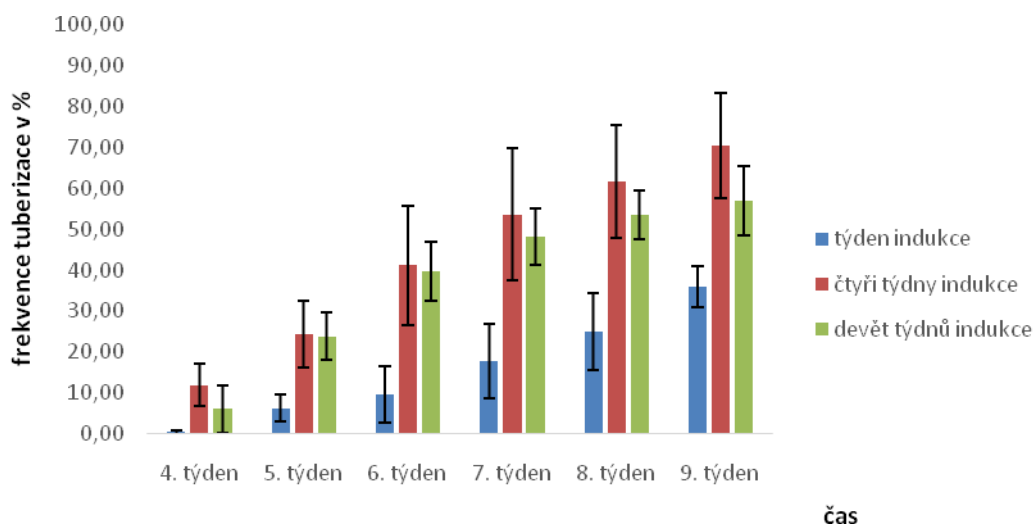
Obrázek č. 11 Tuberizace na jednonodálních segmentech lodyh lilku bramboru.

5.1.1 Hodnocení frekvence tuberizace

U jednonodálních segmentů lilku brambor byla hodnocena frekvence v tvorbě hlíz v podmínkách *in vitro* v závislosti na kultivaci na živném médiu. Z grafu č. 1 je patrné, že frekvence tuberizace v procentech se v jednotlivých týdnech zvyšuje v závislosti na čase. Bylo potvrzeno, že snížené množství anorganického dusíku 12 $\mu\text{mol/l}$ v indukčním médiu v kombinaci s 80 g/l sacharózy a 10 mg/l BA pozitivně působí na tuberizaci, tedy přeměnu stolonu v zásobní hlízu. Delší kultivace na indukčním médiu vede k dřívějšímu zahájení tvorby hlíz a zvýšení jejich počtu. U explantátů, které byly po celou dobu pokusu na indukčním médiu (9. týdnů), došlo zhruba od 7. týdne ke stagnaci vzniku nových hlíz. Ve čtvrtém týdnu experimentu u explantátů po týdenní indukci k tuberizaci prakticky nedošlo, zatímco u dalších dvou skupin explantátů tuberizace dosahovala 11,66 % resp. 6,02 %. K výraznějšímu nárůstu tuberizace u explantátů po týdenní indukci došlo až od sedmého týdne. U explantátů po čtyřech týdnech na indukčním médiu docházelo k nárůstu tuberizace rovnoměrně po celou dobu sledování experimentu. U explantátů s devítitýdenní indukci byl v prvních týdnech nárůst tuberizace vysoký a tedy srovnatelný s druhou variantou. Ke konci pokusu došlo ke zpomalení vzniku nových hlíz, proto se frekvence tuberizace příliš nezvyšovala.

Statisticky průkazný rozdíl byl ve frekvenci tvorby hlíz nalezen pouze mezi explantáty s týdenní indukci a explantáty po čtyřech týdnech indukce, resp. devíti týdnech indukce. Ve čtvrtém týdnu nebyly rozdíly mezi všemi skupinami explantátů statisticky průkazné. Mezi explantáty indukovanými k tuberizaci čtyři týdny, resp. 9 týdnů neexistuje statisticky průkazný rozdíl ve frekvenci tuberizace po celou dobu sledování. U ex-

plantátů po týdenní indukci byl nárůst tuberizace v prvních třech týdnech pozvolný, k většímu nárůstu došlo až později. U této varianty docházelo k nárůstu tuberizace pravidelně od čtvrtého až do devátého týdne. Tuberizace na konci pokusu, tj. v 9. týdnu dosahovala u explantátů po týdenní indukci - 36 %, u explantátů po čtyřtýdenní indukci - 70 % a u explantátů po devítitýdenní indukci 57 %.



Graf č. 1: Srovnání frekvence tuberizace (%) mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

5.1.2 Statistické vyhodnocení frekvence tuberizace

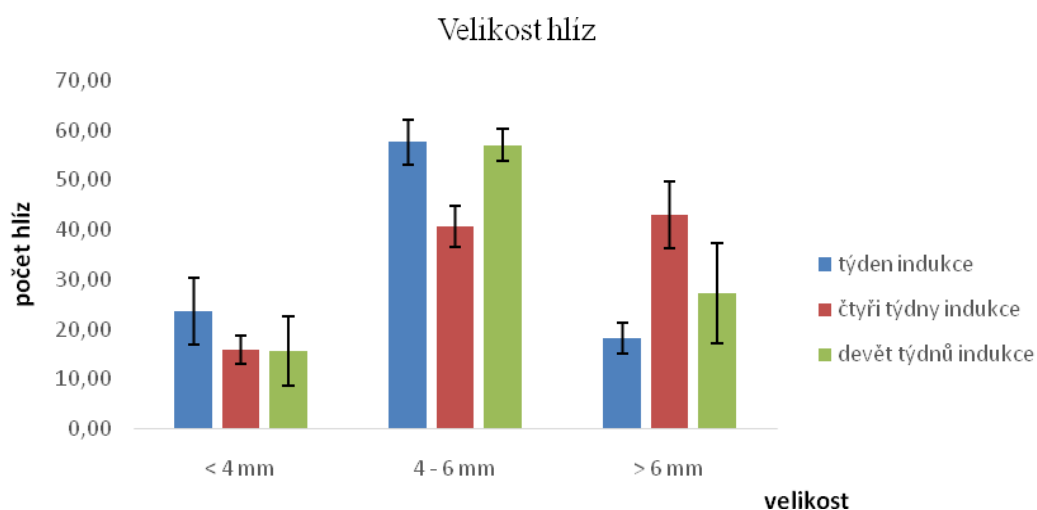
Statistické vyhodnocení tuberizace ukázalo, že existuje statisticky průkazný rozdíl ve frekvenci tuberizace mezi explantáty s týdenní indukci a explantáty s devíti týdny indukce, a také mezi explantáty s délkou indukce jeden týden a explantáty s délkou indukce čtyři týdny. Mezi jednotlivými skupinami explantátů, lišící se délkou kultivace na indukčním médiu v týdnech, nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Ve čtvrtém týdnu byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi explantáty s délkou indukce jeden týden a explantáty s délkou indukce čtyři týdny. V pátém týdnu a stejně tak v šestém týdnu byl statisticky průkazný rozdíl zjištěn mezi explantáty s týdenní a čtyřtýdenní indukci, a také mezi explantáty s délkou indukce jeden týden a explantáty vystavenými devítitýdenní indukci. V sedmém týdnu byl statisticky průkazný rozdíl zjištěn mezi explantáty s týdenní a čtyřtýdenní indukci, a mezi explantáty s týdenní indukci a explantáty s devítitýdenní indukci. V osmém a devátém týdnu byl zjištěn statisticky průkazný

rozdíl mezi explantáty vystavenými týdenní a čtyřtýdenní indukci, a samozřejmě také mezi explantáty s indukcí v délce jednoho týdne a explantáty s indukcí v délce trvání devět týdnů.

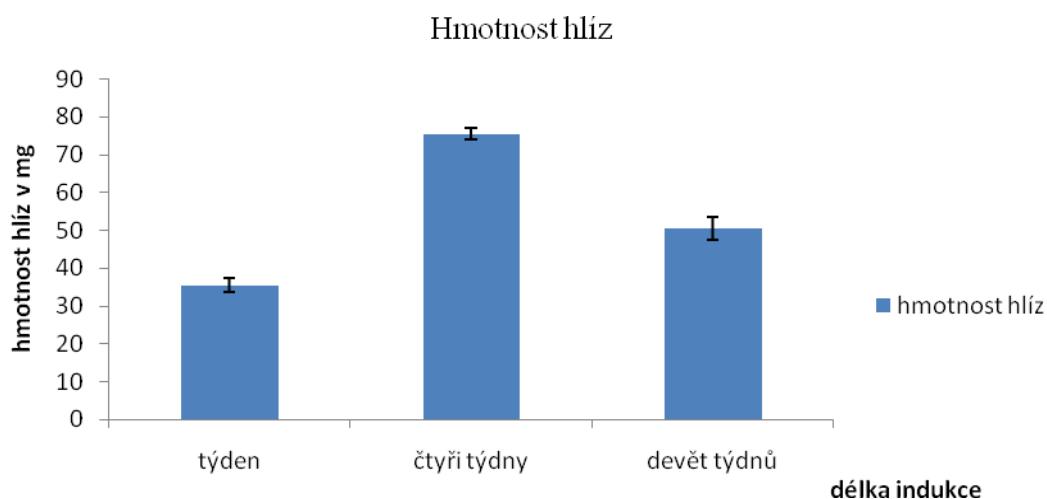
5.1.3 Hmotnost a velikost hlíz

U morfogenetického pokusu po jeho skončení byla provedena analýza velikosti hlíz *graf č. 2* a hmotnosti hlíz *graf č. 3* podle jednotlivých skupin explantátů s rozdílnou délkou indukce. Mezi skupinami explantátů byly zjištěny významné rozdíly *obr. č. 12*, *obr. č. 13* a *obr. č. 14*. Velikost hlíz byla pro přesnější vyhodnocení rozdělena do třech kategorií. Jednalo se o kategorie velikosti hlíz do 4 mm, druhá kategorie zahrnovala hlízy o velikosti 4–6 mm a poslední hlízy větší než 6 mm. U explantátů po jednom týdnu na indukčním médiu převládaly hlízy o velikosti 4 – 6 mm, hlíz v kategorii do 4 mm a nad 6 mm bylo přibližně stejné množství. U explantátů po čtyřech týdnech indukce bylo nejméně hlíz o velikosti do 4 mm, hlíz o velikosti 4 – 6 mm a nad 6 mm bylo dvakrát tolik a srovnatelné množství. U explantátů po devíti týdnech indukce bylo nejvíce hlíz v kategorii 4–6 mm, potom na druhém místě v kategorii 6 mm a nejméně hlíz ve skupině do 4 mm. Bylo zjištěno, že u explantátů po čtyřech týdnech indukce jsou největší hlízy. U explantátů po jednom týdnu na indukčním médiu bylo nejméně hlíz nad 6 mm. U všech skupin explantátů měly největší zastoupení hlízy z kategorie 4–6 mm. V kategorii nad 6 mm bylo nejvíce hlíz na explantátech po čtyřech týdnech indukce, a naopak nejméně na explantátech vystavených indukcí v délce jednoho týdne.

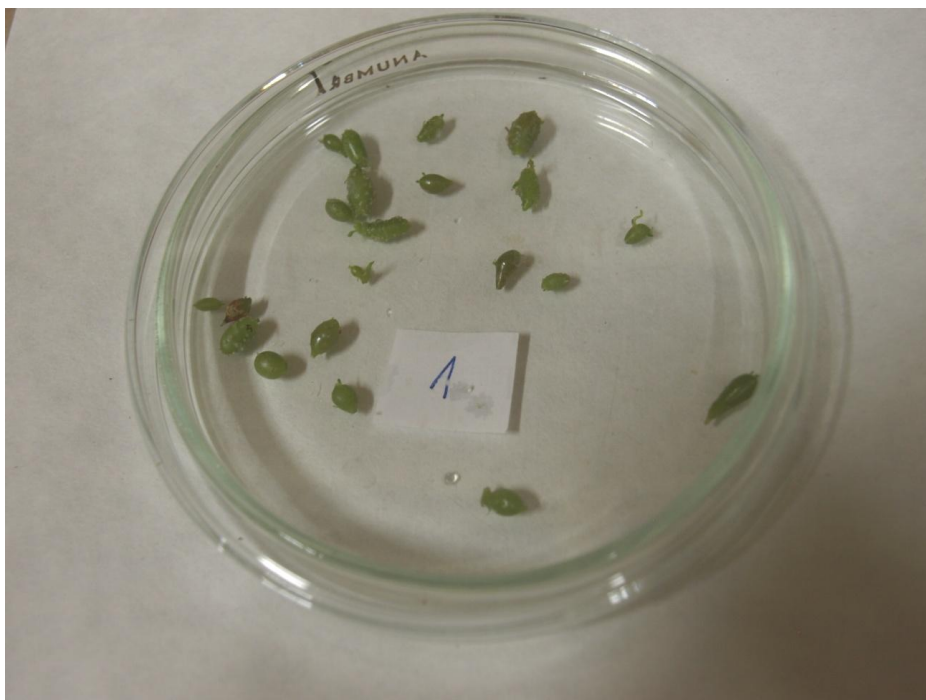
Hmotnost hlíz mezi jednotlivými skupinami explantátů vykazovala výrazné rozdíly. Mezi skupinami explantátů existují statisticky průkazné rozdíly. Průměrná hmotnost hlíz u explantátů po týdenní indukci dosahovala pouze 35,55 mg. Největší hmotnost hlíz byla zjištěna u explantátů po čtyřech týdnech indukce, a to 75,49 mg. U explantátů vystavených devítitýdenní indukci byla hmotnost hlíz nižší oproti skupině explantátů vystavených čtyřtýdenní indukci a dosahovala 50,51 mg. Nejvyšší hmotnost hlíz u explantátů po čtyřech týdnech indukce je způsobena časným vyvoláním indukčního signálu a optimální délkou pro vývoj a růst hlíz. U explantátů, které byly po celou dobu umístěny na indukčním médiu, tj. devět týdnů, negativně působí indukční médium se sníženým obsahem anorganického dusíku a přísadkou 10 mg/l BA. Co se týká explantátů s týdenní indukcí, tam je nižší hmotnost hlíz způsobena pozdějším vyvoláním indukčního signálu.



Graf č. 2: Srovnání velikosti mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.



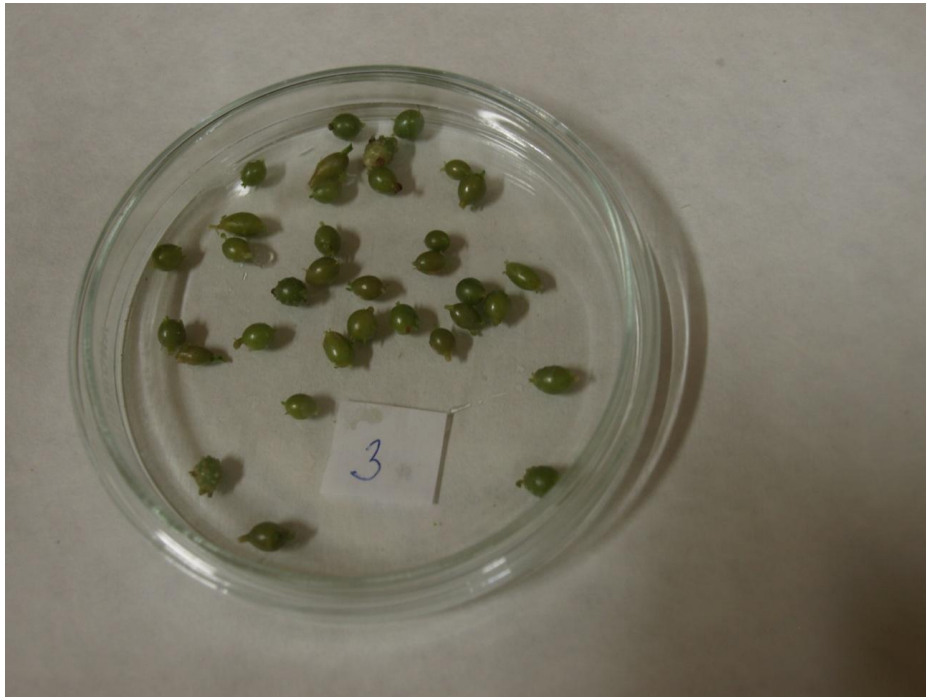
Graf č. 3: Srovnání hmotnosti hlíz mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.



Obrázek č. 12 Hlízy po týdenní indukci.



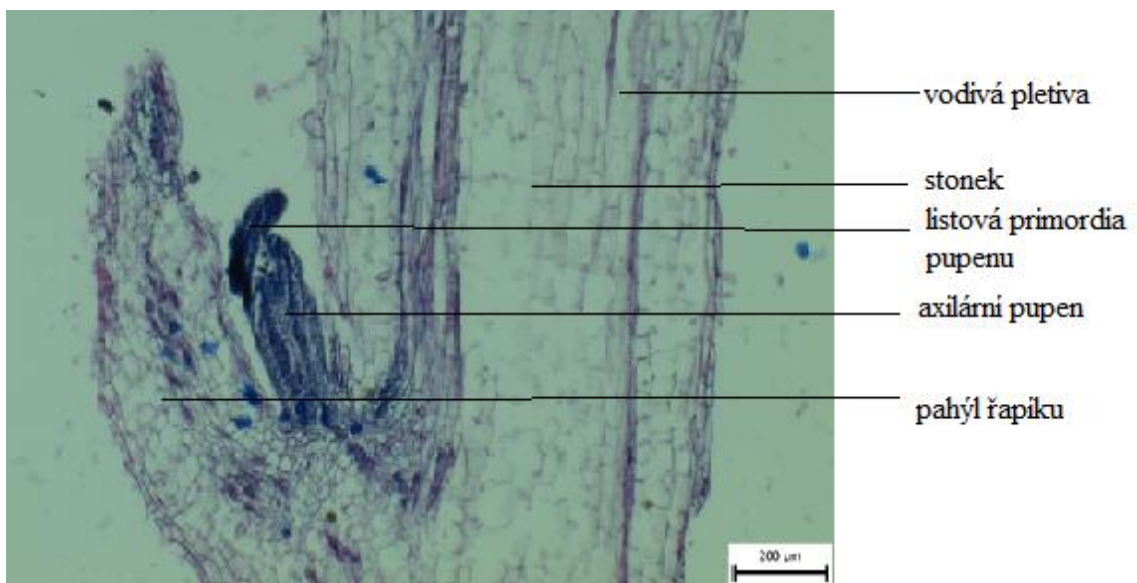
Obrázek č. 13 Hlízy po čtyřtýdenní indukci.



Obrázek č. 14 Hlízy po devítidenní indukci.

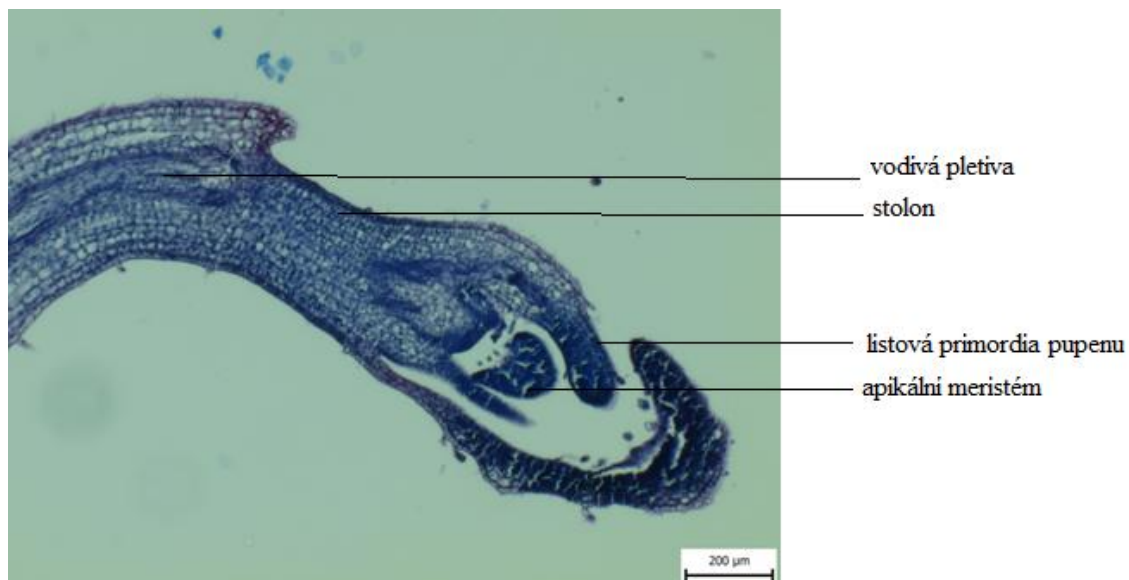
5.2 Anatomické a histologické změny v procesu tuberizace

Pro srovnání anatomických změn v průběhu experimentu byly odebrány i jednonodální segmenty neindukované k tuberizaci demonstrující počáteční anatomickou organizaci pletiv (obr. č. 15).

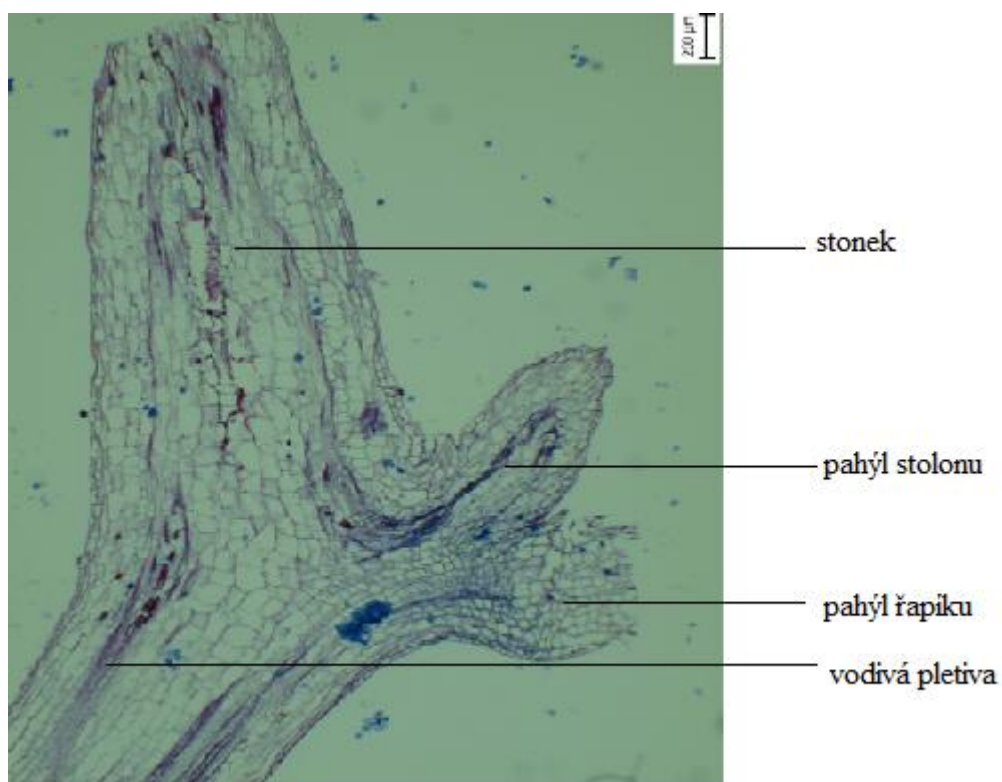


Obrázek č. 15 Jednonodální segment lodyhy s axilárním pupenem.

Na obr. č. 15 je zobrazen axilární pupenový meristém v úžlabí listu jednonodálního segmentu s pahýlem řapíku listu. Na podélném řezu stonkem můžeme vidět vodivé pletivo. V apikální části axilárního pupenu jsou diferenciována listová primordia pupenu.



Obrázek č. 16 Patrná stolonizace na jednonodálním segmentu lodyhy.

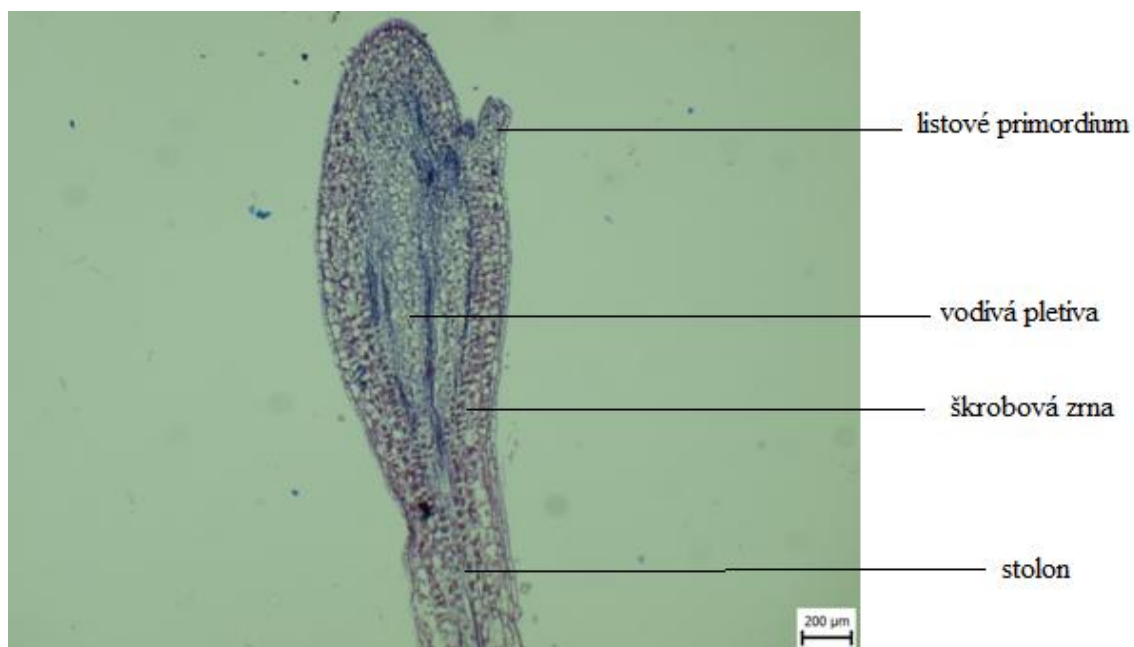


Obrázek č. 17 Jednonodální segment lodyhy s vyvinutějším axilárním pupenem.

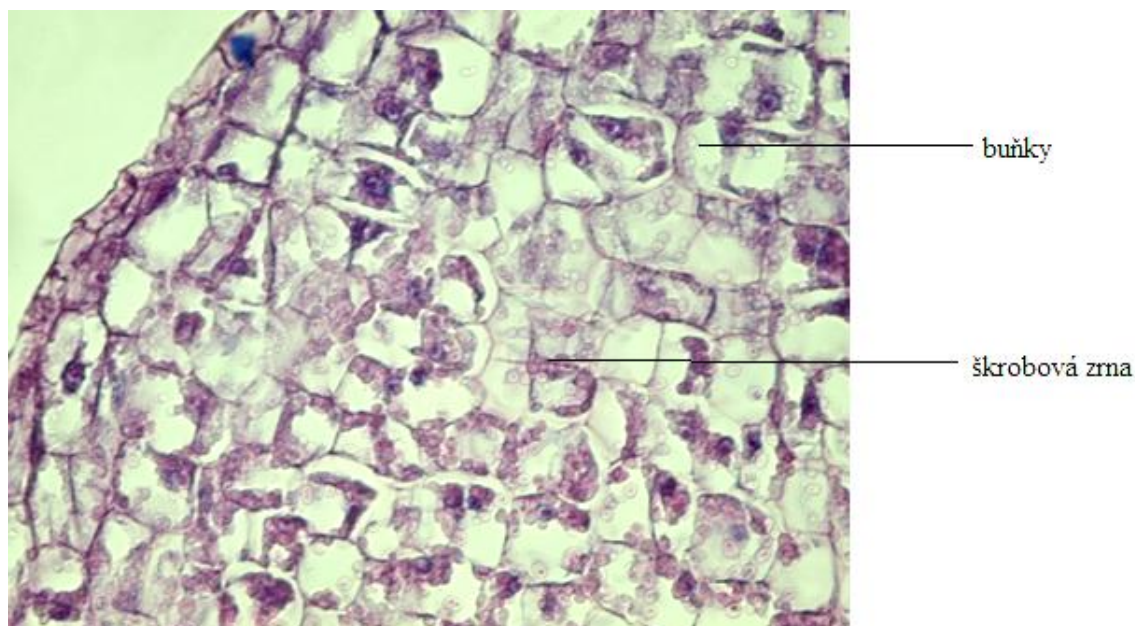
U explantátu po týdnu indukce je patrný stolon, na konci jsou založena listová primordia obr. č. 16 a na obr. č. 17 je znázorněno napojení vodivých pletiv stonku a pahýlu stolonu.



Obrázek č. 18 Přeměna stolonu v hlízu.



Obrázek č. 19 Patrná tuberizace jednonodálního segmentu lodyhy.



Obrázek č. 20 Škrobová zrna v parenchymatickém pletivu hlízy.

Hlíza na stolonu ve čtvrtém týdnu od založení pokusu a detail samotné hlízy je znázorněna na *obr. č. 18 a obr. č. 19*. Na obrázku můžeme vidět histologický přechod rozlišení pletiva stolonu a hlízy. Stonek i hlíza jsou společně propojeny vaskulárním pletivem. V hlíze můžeme vidět základní meristém. V detailnějším pohledu na hlízu můžeme pozorovat škrobová zrna *obr. č. 20*.

5.3 Změny obsahu růstových regulátorů v průběhu tvorby hlíz

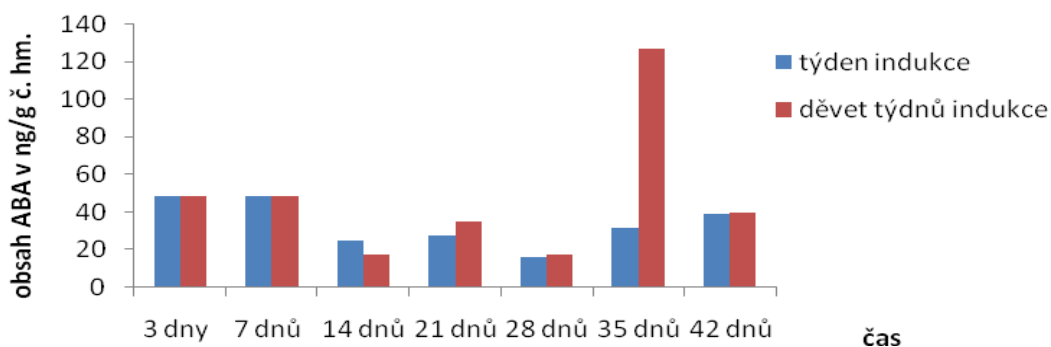
5.3.1 Změny v obsahu ABA v jednonodálním segmentu a ve stolonu

Stanovení endogenní hladiny ABA v jednonodálních explantátech stonku lilku bramboru ukázalo na dynamiku změn hladiny ABA a na rozdíl v akumulaci ABA v segmentech. Změny v obsahu ABA v jednonodálním segmentu jsou zobrazeny v *grafu č. 4* a stolonu *graf č. 5*. Jednalo o explantáty s jedním týdnem kultivace na indukčním médiu a o explantáty, které byly na indukčním médiu po celou dobu pokusu, měly detekovatelný obsah ABA nad 20 ng/g čerstvé hmotnosti. Obsah ABA u explantátů po týdenní indukci byl v prvních dvou týdnech konstantní a vysoký. Ve třetím týdnu došlo k poklesu v obsahu ABA v jednonodální segmentu stonku. Zároveň byl vyvolán indukční signál pro zahájení tuberizace, který souvisí se zvýšenou produkcí ABA, která se syntetizuje v listu, především v plastidech. Od pátého týdne u explantátů s týdenní indukci došlo opět k nárůstu obsahu ABA, což je způsobeno tím, že je hlíza již vytvořena a nedochází k distribuci ABA do ní v takové míře. Co se týká explantátů

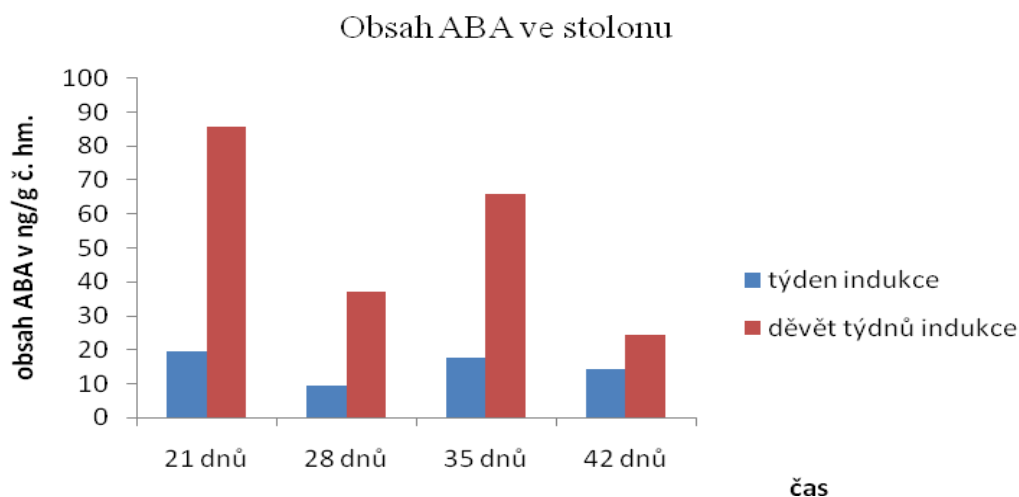
s devítitýdenní indukcí, tam bylo maximum v obsahu ABA dosaženo ve třetím, resp. pátém týdnu 120 ng ABA/g č. hm. V šestém týdnu u explantátů s devítitýdenní indukcí došlo k poklesu a výsledné hodnoty obsahu ABA byly srovnatelné u obou skupin explantátů. Po třech, resp. sedmi dnech byly hodnoty u obou skupin explantátů srovnatelné.

Co se týká obsahu endogenní ABA ve stolonu, tak tam byly rozdíly mezi explantáty s rozdílnou délkou indukce poměrně výrazné. Obsah ABA ve stolonu byl měřen od třetího týdne (stolon byl již dostatečně velký) až do šestého týdne. Obsah ABA u explantátů s týdenní indukcí byl nízký do 20 ng/g č. hm., avšak od pátého týdne došlo k mírnému nárůstu, což je spjato se vznikem hlízy. U explantátů vystavených devítitýdenní indukcí byla naměřena nejvyšší koncentrace ABA ve třetím týdnu 85 ng/g č. hm., a poté ve čtvrtém týdnu došlo k poklesu. V pátém týdnu u explantátů vystavených devítitýdenní indukcí došlo opět k nárůstu obsahu ABA ve stolonu, a na to následoval pokles v šestém týdnu.

Obsah ABA v jednonodálním segmentu



Graf č. 4: Změny v obsahu ABA v jednonodálním segmentu mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.



Graf č. 5: Změny v obsahu ABA ve stolonu mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

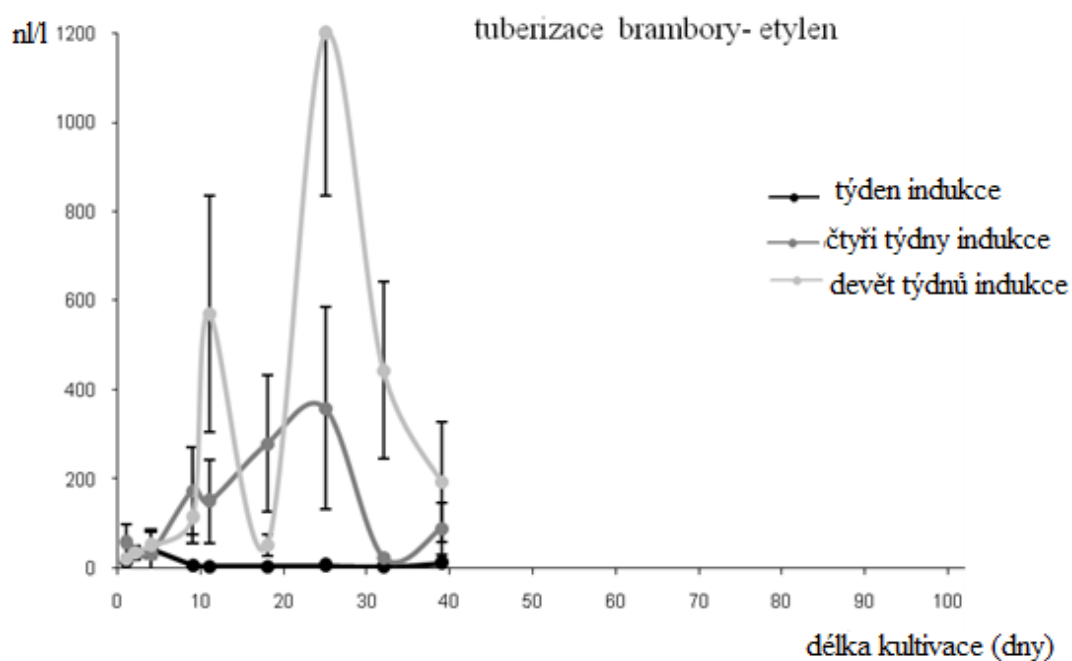
5.3.2 Hodnocení produkce etylenu, etanu a CO₂

Z grafu č. 6 je patrné, že nejnižší produkce etylenu byla zaznamenána u explantátů vystavených týdenní indukci, kde hodnoty etylenu byly téměř zanedbatelné. U explantátů se čtyřtýdenní indukci docházelo k nárůstu obsahu etylenu až do 25. dne od založení pokusu a poté došlo k poklesu. Vysoká koncentrace etylenu u explantátů s devítitýdenní indukci může být způsobena několika faktory. Jedním z nich je fakt, že u této skupiny explantátů nebyl proveden přenos jednonodálních segmentů lodyh na druhé médium, při tomto přenosu se pravděpodobně sníží obsah etylenu v nádobě. Druhým důvodem je, že u explantátů s devítitýdenní indukci došlo k větší produkci hlíz oproti ostatním skupinám explantátů, což je spojeno i s větší produkcí etylenu.

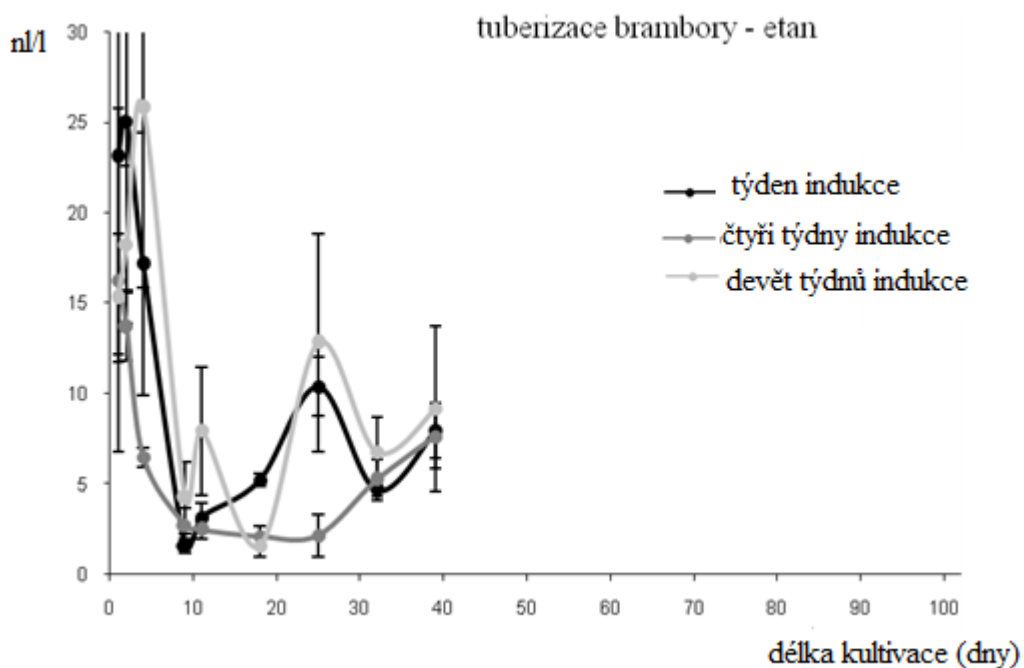
Produkce etanu, jak ukazuje graf č. 7, byla vyrovnanější mezi explantáty různé délky indukce oproti dynamice obsahu etylenu. U všech explantátů, kromě explantátů s týdenní indukci, byly nejvyšší koncentrace etanu na začátku pokusu a poté došlo k jejich poklesu a jejich opětovnému zvýšení okolo 25. dne od založení pokusu. U explantátů s týdenní indukci došlo k nárůstu obsahu etanu od 32. dne od počátku pokusu.

U obsahu CO₂ graf č. 8 byly mezi jednotlivými skupinami explantátů významné rozdíly. Naplnil se předpoklad, že nejnižší koncentrace CO₂ byla naměřena u explantátů s týdenní indukci, a naopak nejvyšší koncentrace u explantátů s devítitýdenní indukci. Nižší produkce CO₂ je vyvolána kratší délkou kultivace explantátů na indukčním médiu

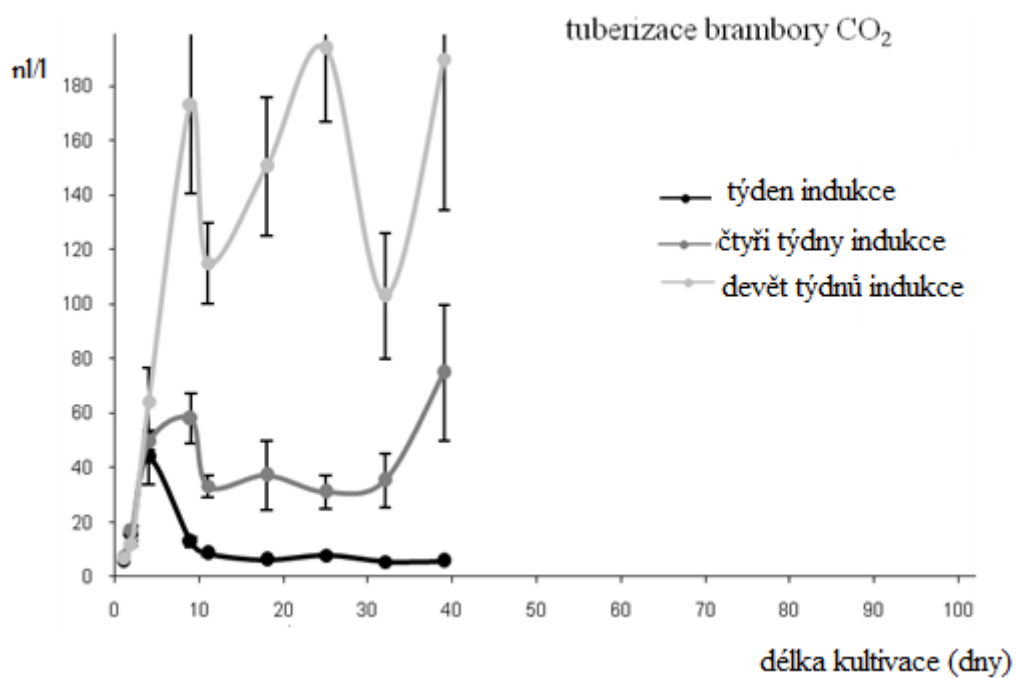
a nižší frekvencí tuberizace. U explantátů s indukcí jeden týden byly první hodnoty vyšší a poté došlo k jejich poklesu. U explantátů se čtyřmi týdny indukce byly hodnoty celkem vyrovnané, ale ke konci měření došlo k nepatrnému nárůstu. U explantátů vystavených devítitýdenní indukci byl obsah CO₂ v porovnání s předchozími skupinami explantátů podstatně vyšší, ale docházelo k výkyvům v průběhu měření. Vysoká produkce CO₂ u explantátů s devítitýdenní indukci je způsobena intenzivnější přeměnou stolonů v zásobní hlízy, oproti dalším dvěma skupinám explantátů.



Graf č. 6: Změny v produkci etylenu mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.



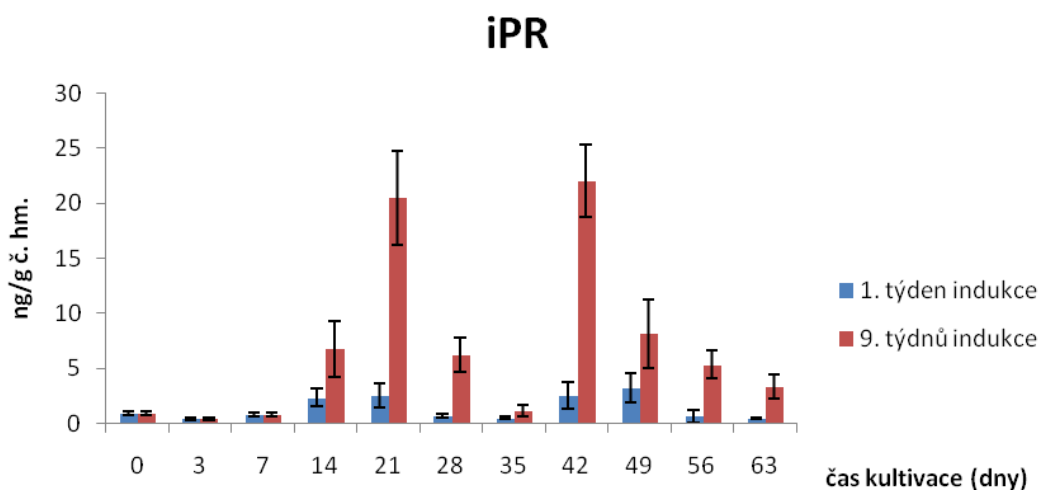
Graf č. 7: Změny v produkci etanu mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.



Graf č. 8: Změny v produkci CO₂ mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

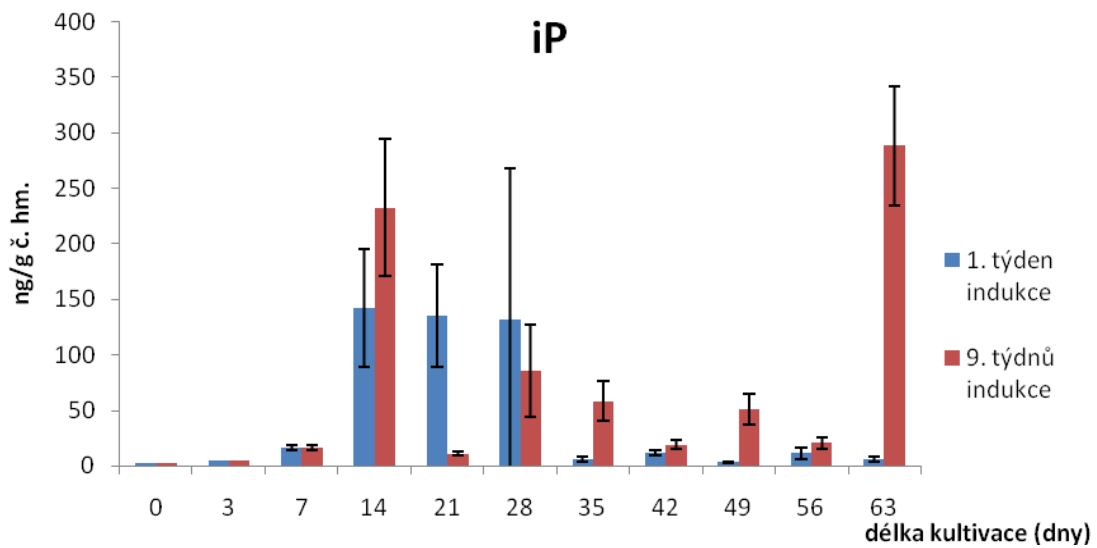
5.3.3 Porovnání dvou skupin explantátů v obsahu cytokininů

Obsah jednotlivých cytokininů se výrazně lišil, byly nalezeny rozdíly jak mezi jednotlivými cytokininy, tak mezi skupinami explantátů vystavených rozdílné délce indukce. Byly porovnávány dvě skupiny explantátů, první vystavena týdenní indukci a druhá umístěná na indukčním médiu po celou dobu trvání pokusu, tj. devět týdnů. Endogenní obsah cytokininů je uveden v nanogramech na gram čerstvé hmotnosti (ng/g č. hm.). Nejvíce byly zastoupeny iPR a BA stovky nanogramů. Obsah iPR a mTR byl v desítkách nanogramů. Obsah v jednotkách až desítkách nanogramů byl u BAR. Nejméně byly zastoupeny dHZ, dHZR, mT a tZ v obsahu méně než 5 ng.



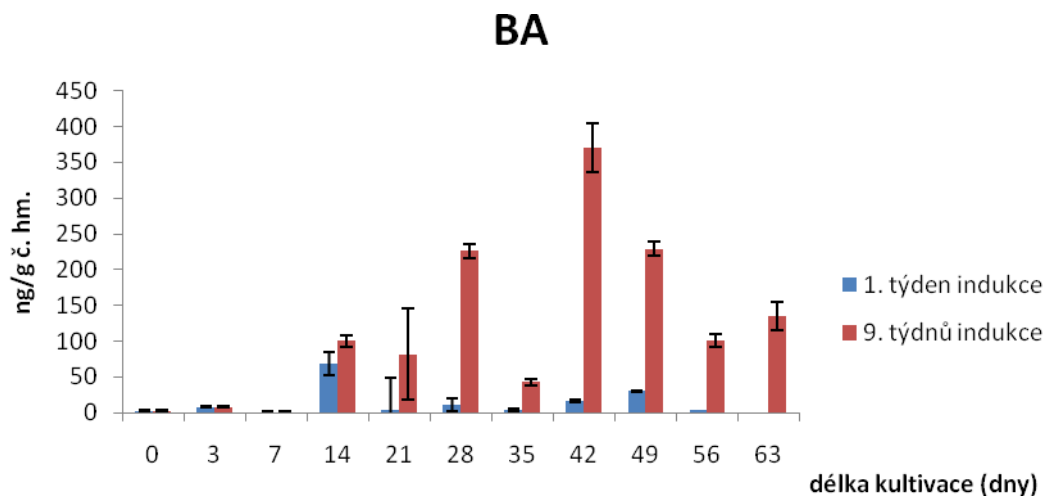
Graf č. 9 Obsah endogenního iPR v průběhu tuberizace.

Obsah endogenního iPR byl nižší u explantátů po týdenní indukci oproti explantátům vystaveným devítitýdenní indukci *graf č. 9*. Nejvyšší koncentrace až 20 ng/g č. hm. byla naměřena v období tvorby hlíz.



Graf č. 10 Obsah endogenního iP v průběhu tuberizace.

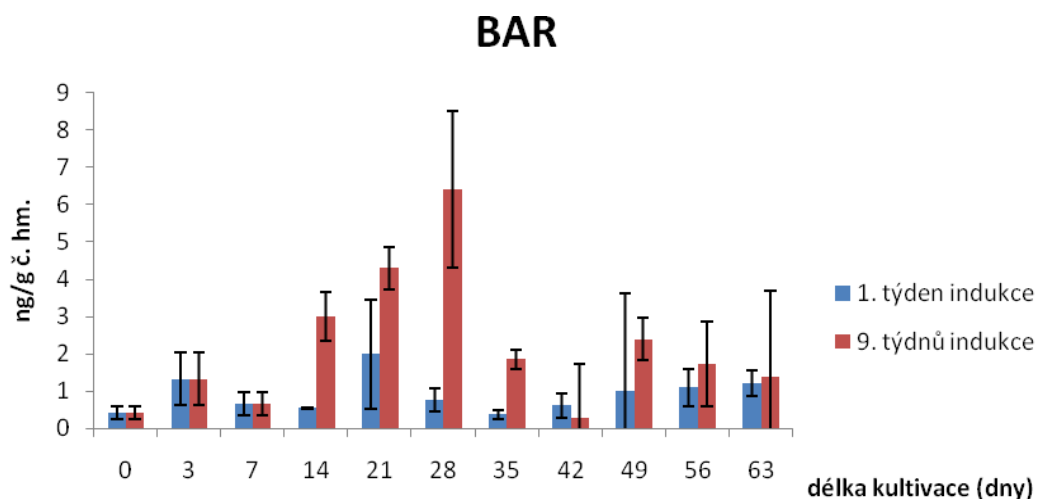
Nejvyšší obsah iP graf č. 10, u explantátů po týdenní indukci byla naměřena od druhého do čtvrtého týdne od založení pokusu v hodnotě okolo 135 ng/g č. hm. Co se týká druhé skupiny explantátů, tam postupně obsah iP roste, poté klesá a nejvyšší hodnoty dosahuje na konci pokusu. Obsah iP byl výrazně vyšší v porovnání s iPR zhruba 7–20x.



Graf č. 11 Obsah endogenního BA v průběhu tuberizace.

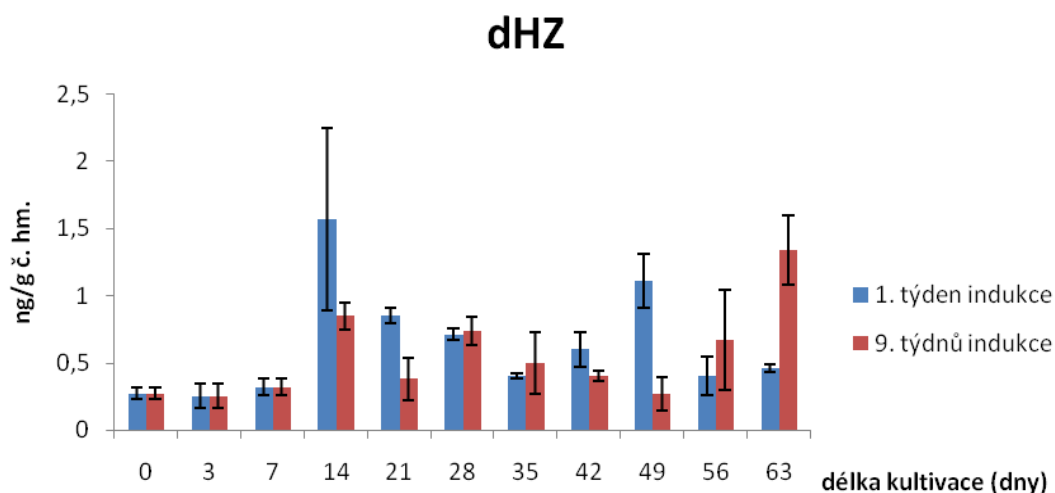
V případě BA graf č. 11 byl obsah tohoto cytokininu ze všech nejvyšší, dosahoval až k 300 ng/g č. hm. Vyšší obsah byl naměřen u explantátů vystavených devíti týdnům

na indukčním médiu. Maximum dosahoval v období tvorby hlízy. Týdenní indukce explantátů nevedla k vysokému nárůstu endogenního BA.



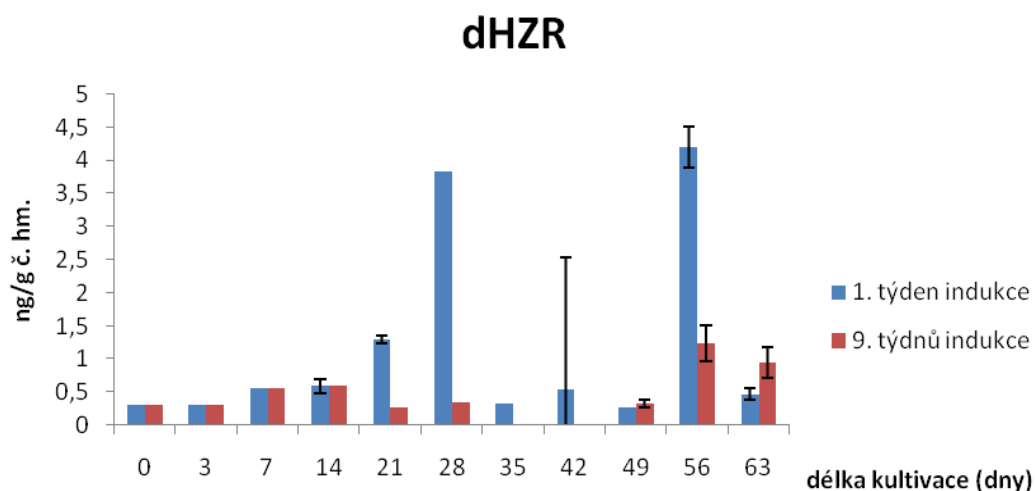
Graf č. 12 Obsah endogenního BAR v průběhu tuberizace.

Obsah BAR graf č. 12 byl vyšší u explantátů vystavených devítitýdenní indukci. Zase je zde vliv delšího působení BA v médiu, který má vliv i na obsah BAR v segmentech, asi dochází k metabolizaci. Obsah u explantátů po týdenní indukci byl zhruba čtyřikrát nižší. Nejvyšší hodnoty BAR byly od druhého do čtvrtého týdne. Zvýšený obsah BAR může souviset s indukcí tuberizace.



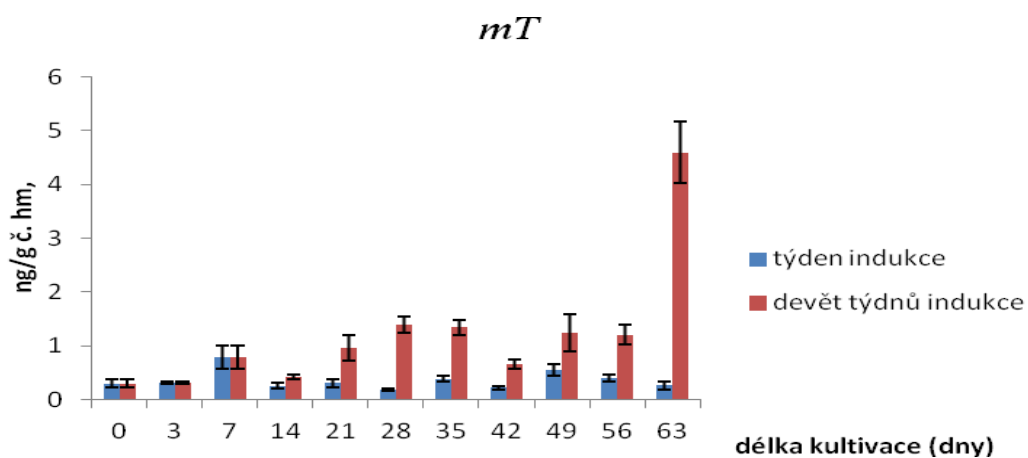
Graf č. 13 Obsah endogenního dHZ v průběhu tuberizace.

Rozdíly obsahu dHZ *graf č. 13* explantáty obou různých indukcí tvorby hlíz byly přibližně vyrovnané. Nejvyšší obsahy byly naměřeny v období indukce tuberizace a začátku tvorby hlíz. Hodnoty oproti jiným endogenním cytokininům byly výrazně nižší, pravděpodobně dHZ nehraje významnou roli v indukci a průběhu tuberizace.



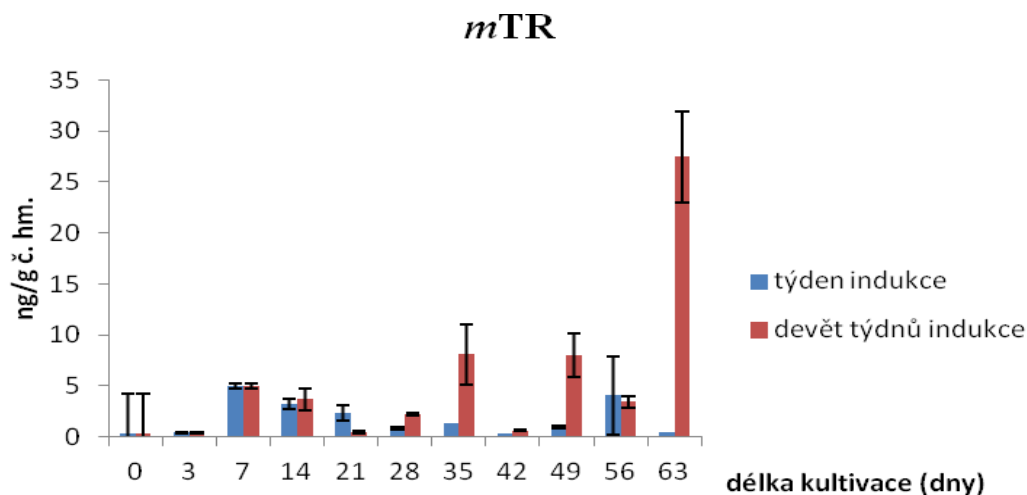
Graf č. 14 Obsah endogenního dHZR v průběhu tuberizace.

Obsah dHZR *graf č. 14* byl zhruba dvakrát vyšší oproti dHZ. Vyšší koncentrace byly naměřeny u explantátů vystavených týdenní indukci. Nejvyšší koncentrace byly u této skupiny explantátů naměřeny v období okolo třetího týdne, poté došlo k poklesu a následnému nárůstu obsahu dHZR.



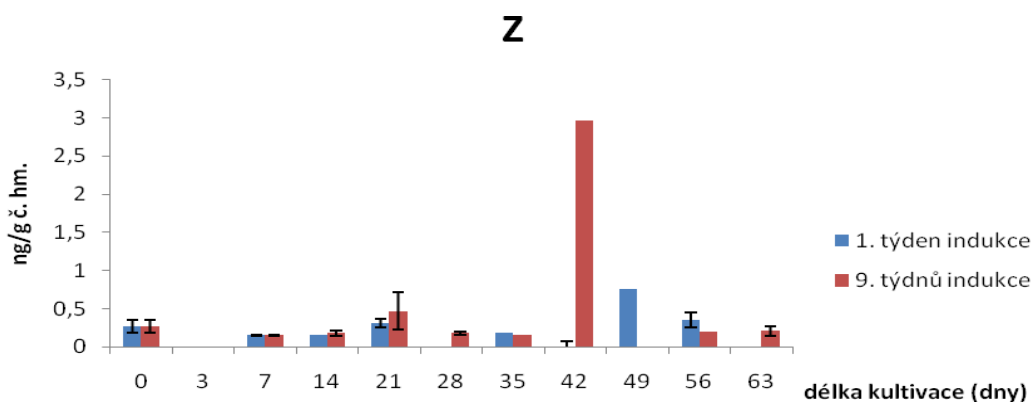
Graf č. 15 Obsah endogenního mT v průběhu tuberizace.

Obsah *mT* graf č. 15 byl vyrovnaný v průběhu celého pokusu, o něco vyšší hodnoty byly stanoveny u explantátů vystavených devítitýdenní indukci. Hodnoty se pohybovaly okolo 2 ng/g č. hm. U explantátů s devítitýdenní indukci bylo maximum naměřeno v devátém týdnu, zhruba 5 ng/g č. hm.



Graf č. 16 Obsah endogenního *mTR* v průběhu tuberizace.

Obsah *mTR* byl oproti *mT* zhruba desetkrát vyšší graf č. 16. Vyšší hodnoty byly naměřeny u explantátů po devíti týdnech indukce. Nejvyšší hodnota byla naměřena v devátém týdnu indukce, téměř 30 ng/g č. hm. Co se týká explantátů s týdenní indukci, tam byly hodnoty endogenních cytokininů zanedbatelné a vyrovnané po celou dobu průběhu pokusu.



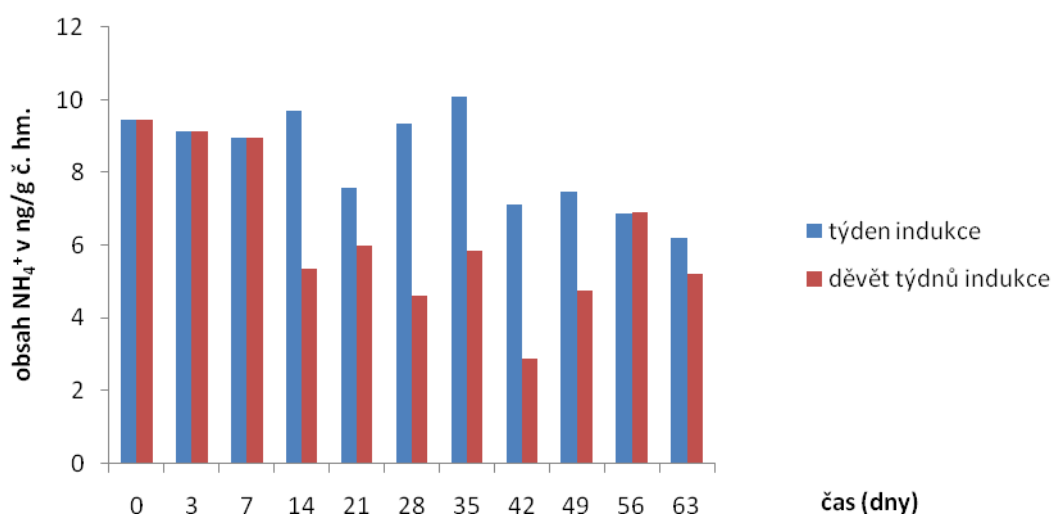
Graf č. 17 Obsah endogenního Z v průběhu tuberizace.

V případě *Z graf č. 17* byly obsahy endogenního cytokininu celkem nízké a vyrovnané, v některých případech nebyl žádný *Z* detekován, ale je tu vysoký pík 2,5 ng ve 42 dnech u explantátů s devítitýdenní indukcí. Mezi skupinami explantátů byly dosahovány také podobné hodnoty.

Co se týká *ZR*, tam nebo zjištěno žádné měřitelné množství tohoto endogenního cytokininu.

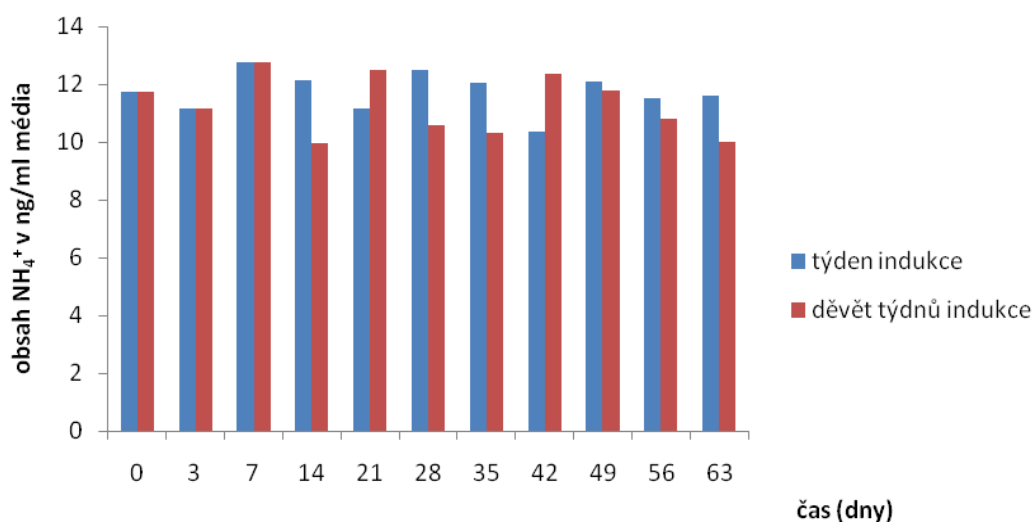
5.3.4 Obsah dusíku v jednonodálních segmentech lodyh a médiu

5.3.4.1 Stanovení amonného dusíku spektrofotometricky



Graf č. 18 Obsah amonného dusíku v jednonodálních segmentech lodyh brambor.

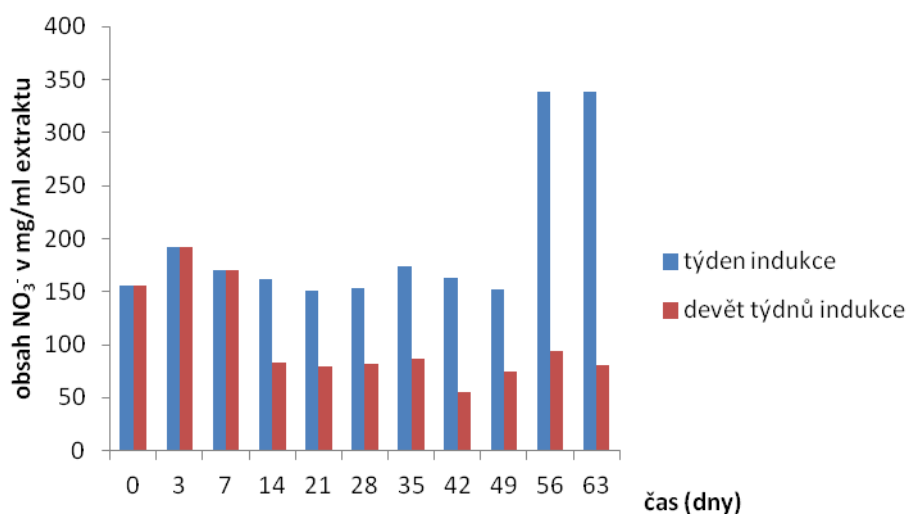
Obsah dusíku v jednonodálních segmentech lodyh brambor byl v případě explantátů vystavených týdenní indukcí přibližně stejně vysoký po celou dobu pokusu *graf č. 18*, pohyboval se okolo 10 ng/g č. hm. Co se týká explantátů vystavených devítitýdenní indukcí, tam byl obsah amoniakálního dusíku zhruba o třetinu nižší v porovnání s první skupinou explantátů. Explantáty s týdenní indukcí byly přeneseny po týdnu na MS médium, kde je obsah dusíku vyšší.



Graf č. 19 Obsah amonného dusíku v médiu.

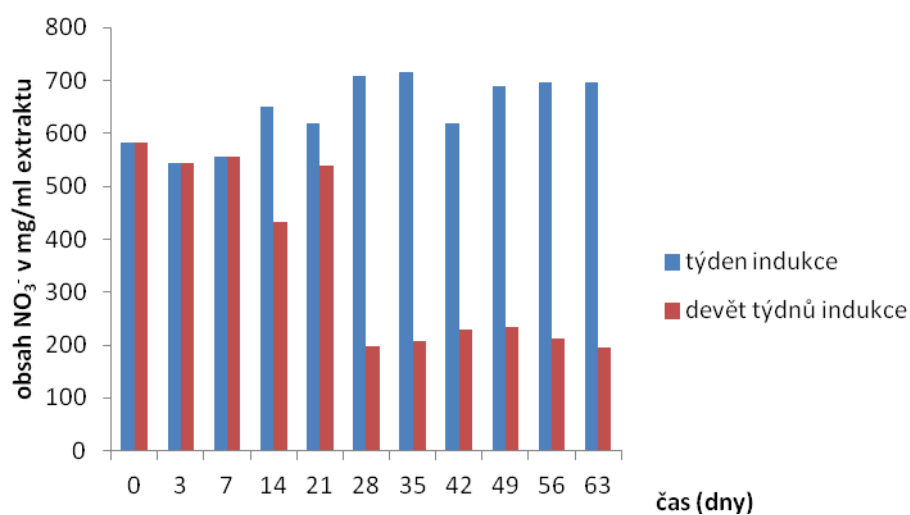
Obsah amonného dusíku v médiu graf č. 19 mi v případě obou skupin explantátů vyšel přibližně stejně. Obsah se pohyboval přibližně okolo 10 ng/g média.

5.3.4.2 Stanovení nitrátových iontů pomocí indikačních papírků



Graf č. 20 Obsah nitrátových iontů v jednonodálních segmentech lodyh bramboru.

Obsah nitrátových iontů graf č. 20 byl vyšší u explantátů vystavených týdenní indukci, což je způsobeno přenosem na MS médium. Co se týká explantátů vystavených devítitýdenní indukci, tam byl obsah téměř poloviční, oproti explantátům s týdenní indukcí.



Graf č. 21 Obsah nitrátového dusíku v médiu.

Obsah nitrátového dusíku v médiu *graf č. 21*, zejména co se týká média, na kterých rostly explantáty jeden týden, byl téměř třikrát vyšší než obsah dusíku v rostlinném materiálu. Obsah nitrátového dusíku postupně klesal v médiu u explantátů vystavených devítitýdenní indukci.

6 DISKUSE

Biotechnologické přístupy v produkci sadbových hlíz bramboru zaznamenaly v posledních desetiletích významný metodický posun, který má četné aplikační návaznosti. Především jde o produkci viruprostého materiálu, urychlení šlechtitelského procesu. Simulace podmínek pro tuberizaci jednonodálních segmentů lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) *in vitro* nám umožňuje optimalizovat podmínky pro pěstební technologie, šlechtění a udržovací množení odrůd. Kultivace lilku bramboru za účelem tuberizace *in vitro* nám umožňuje simulovat takové podmínky, jako je výživa, teplota, fotoperioda a další. Jedná se o morfogenetický proces, který je modifikován celou řadou faktorů a jedním z nich je i úroveň dusíkaté výživy. Bylo zjištěno, že optimalizací dusíkaté výživy lze ovlivnit zejména výnos, vitalitu a kvalitu hlíz. MCGRADY a EWING 1990 zjistili, že snížený obsah dusíku v MS médiu, v porovnání se standardním obsahem dusíku v živném médiu, vede k vyšší frekvenci tvorby hlíz.

Účinek dusíkaté výživy na tuberizaci bramboru byl sledován v řadě studií. GAO et al. (2014) přišli s tím, že obsah nitrátového dusíku v médiu pozitivně působí na růst stolonů. Ke stejným výsledkům jsem dospěla i ve svém experimentu. Platilo, že kratší vystavení explantátů médiu s nižším obsahem dusíku vedlo k méně intenzivní stolonizaci, tzn. explantáty, které byly na indukčním médiu čtyři týdny, resp. devět týdnů, odpovídaly silnější stolonizaci. Zároveň jsem potvrdila, že čím byla delší kultivace na indukčním médiu, tím dříve nastala iniciace a indukce tvorby hlíz. Současně došlo k přeměně většího množství stolonů v hlízy. GAO et al. (2014) ve svém experimentu potvrdili předpoklad, že vysoký příjem dusíku explantáty inhibuje tuberizaci. Tento jev se v mém experimentu projevil u kontrolní varianty (devět týdnů na indukčním médiu se sníženým obsahem anorganického dusíku) ke konci pokusu, kdy došlo ke stagnaci ve vytváření nových hlíz. Indukce tvorby hlíz na médiu se sníženým obsahem dusíku způsobila pravidelný přírůstek nových hlíz po celou délku pokusu.

EBADI a IRANBAKSHI (2011) zjišťovali vhodné množství sacharózy a BA v médiu, které má pozitivní vliv na intenzitu tuberizace a dobu indukce tvorby hlíz. Jako ideální indukční médium pro produkci dostatečného množství hlíz, čerstvou hmotnost, vitalitu hlíz a dormanci, bylo popsáno médium s obsahem 80 g/l sacharózy a 10 mg/l BA. Tento předpoklad se mi podařilo ověřit i v mém experimentu. Obsah 80 g/l

sacharózy a 10 mg/l v médiu má pozitivní vliv na průběh tuberizace, který byl v mém případě ještě umocněn sníženým obsahem anorganického dusíku na 12 μ mol v médiu. Navozené podmínky směřovaly k vyšší frekvenci tuberizace jednonodálních segmentů lodyh lilku bramboru. Sacharóza a BA jsou považovány za nezbytné složky indukčního média, které mohou zkrátit období zahájení tuberizace (EBADI a IRANBAKHS 2011). Tento proces byl potvrzen i v mém experimentu, že délka indukce hraje roli ve vyvolání indukčního signálu. Bylo zjištěno, že explantáty vystavené čtyřtýdenní indukci se jeví jako ideální pro produkci sadby *in vitro*. U explantátů vystavených týdenní indukci je tato doba příliš krátká na to, aby mohlo dojít k optimální indukci a iniciaci hlíz. Zatímco u kontroly, která byla devět týdnů na indukčním médiu, dochází v posledních týdnech kultivace k omezení vzniku nových hlíz. Vysoká koncentrace dusíku v médiu, a především jeho dlouhé působení na explantáty, tuberizaci inhibují.

Tuberizaci však ovlivňují i endogenní faktory, mezi nimi fytohormony. Z těch jsem se zaměřila na ABA, CK a etylén. Změny hladin obsahu endogenní ABA ukázaly, že ABA má pozitivní vliv na indukci tuberizace. V průběhu kultivace došlo ke změně koncentrace obsahu endogenní ABA v jednonodálním segmentu lodyhy patrně vlivem indukce a iniciace růstu hlíz. KRAUSS a MARSCHNER (1982) dospěli k závěru, že snížené množství dusíku v médiu podporuje syntézu ABA v jednonodálním segmentu lodyhy lilku bramboru a tím i tuberizaci. Se zvýšenou syntézou a akumulací endogenní ABA v rostlinných pletivech souvisí vystavení jednonodálních segmentů lodyh stresu (CHRISTMANN et al. 2006). Z mého experimentu vyplývá, že zvýšený obsah ABA ve čtvrtém týdnu pravděpodobně souvisí s iniciací a indukcí tvorby hlíz. Ve čtvrtém týdnu dochází k tvorbě hlízy, a tím dosahuje obsah ABA ve stolonu svého maxima. Vyšší obsahy ABA u explantátů s devítitýdenní indukci souvisejí s větší frekvencí vzniku hlíz oproti skupině explantátů, která je pouze jeden týden na indukčním médiu.

DHITAL a LIM (2012) ve svém pokusu zjistili, při použití dvounodálních segmentů vzniká na jednom explantátu v průměru 1,5 hlízy. Hmotnost hlíz v tomto pokusu se pohybovala okolo 500 mg. V mém případě se vždy na jednonodálním segmentu vytvořila právě jedna hlíza. Hlízy byly zpravidla na konci stolonu, některé v úžlabí jednonodálního segmentu. Některé hlízy byly zanořeny v médiu. Co se týká hmotnosti hlíz v mém pokusu, tak hlízy dosahovaly hmotnosti okolo 50 mg, byly patrné rozdíly mezi variantami, způsobené rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu. Nižší hmotnost

hlíz je pravděpodobně způsobena nedostatkem živin v tuhém živném médiu a krátkou dobou kultivace. PARK et al. (2009) ve svém pokusu získali hlízy o velikosti 4–6 mm označené jako malé, 6–8 mm střední a nad 8 mm jako velké. V mém případě měly největší podíl hlízy o velikosti 4–6 mm. Větší velikost hlíz v případě pokusu PARK et al. (2009) je způsobena delší kultivací, která v tomto případě trvala čtyři měsíce, zatímco v mém pokusu délka kultivace trvala devět týdnů. U explantátů, které byly po celou dobu umístěny na indukčním médiu, tj. devět týdnů, negativně působí indukční médium se sníženým obsahem anorganického dusíku a přísadou 10 mg/l BA, což vede k tomu, že hlízy nenarostou tak velké, jako v případě explantátů se čtyřmi týdny indukce.

Na úrovni morfogeneze hlízy – anatomie sledovali IRANBAKHSH et al. (2007) průběh tuberizace. Cílem pokusu bylo porovnat strukturu pupenů vystavených indukčním a neindukčním podmínkám. Za indukčních podmínek meristematické buňky s hustou cytoplazmou a dělicím jádrem expandují do hlubších vrstev pupenu, oproti pupenu vystavenému neindukčním podmínkám. První známkou mikrotuberizace je zvýšení velikosti kortikálních parenchymatických buněk v dolní části pupenu. Popisují zvýšení aktivity dělení iniciály a dělení buněk v subapikální zóně s následkem zvýšení počtu buněk v dřeni. Konečná velikost hlíz je výsledkem zvýšení velikosti buněk, zejména v nejnvnitřnějších buňkách kortikálního parenchymu a kolem dřene. Již po čtvrtém dni můžeme pozorovat, po umístění na indukční médium, dělení buněk v subapikální oblasti. Později se začnou dělit buňky v apikální oblasti meristému. Studie na několika podélných řezech ukazuje, že růst mikrohlíz je akropetální proces a začíná pod apikálním meristémem. Postupně se ve vakuolizovaných buňkách začíná hromadit škrob v rostoucích internodiích pod subapikální oblastí. Hromadění škrobu v buňkách způsobí růst hlíz v délce i šířce. Obdobné výsledky popisují i mnou připravené mikrofotografie.

Produkce etylénu byla nejvyšší u explantátů, které byly devět týdnů na indukčním médiu. Koncentrace byla nízká, protože nedocházelo k potlačení tuberizace u jednonodálních segmentů lodyh bramboru, jak ve své práci uvádí MINGO-CASTEL et al. (1974). Dále uvádějí, že v důsledku vysokého obsahu etylénu v nádobě a nedostatku oxidu uhličitého dochází k tvorbě světlých kalusů bez obsahu chlorofylu na bázi stolonů rostlin bramboru. Tento jev jsem bohužel ve svém pokusu nepozorovala. U ostatních dvou variant byla produkce nižší, což může být způsobeno přenesením explantátů z indukčního média na MS médiu a obnovení mikroklimatu v baňce, zejména to bylo

patrné u explantátů s čtyřtýdenní indukcí. Podle VREUGDENHIL a VAN DIJK (1989) by měl etylén blokovat prodloužení stolonů a potlačovat iniciaci hlíz. V mém pokusu byla koncentrace etylénu zřejmě příliš nízká na to, abych mohla tento jev pozorovat. Produkce etylénu souvisí se stresem, kterému jsou jednonodální segmenty vystaveny. Stres je vyvolán porušením integrity rostliny a vystavení indukčnímu médiu. Eten může být také markerem stresu, a v případě mého experimentu nebyly rozdíly v produkci etanu mezi explantáty s různým způsobem indukce tuberizace tak významné. Koncentrace CO₂ v kultivační nádobě souvisí s frekvencí tuberizace, proto nejvyšší koncentrace byla naměřena u explantátů vystavených devítitýdenní indukcí.

Ze všech měřených endogenních cytokininů byl naměřen nejvyšší obsah BA, což pravděpodobně souvisí s tím, že tento CK byl přidáván do indukčního média s cílem vyvolat u jednonodálních segmentů lodyh lilku brambor tuberizaci. V případě BAR tam byl naměřen obsah výrazně nižší oproti BA. Je možné, že v explantátech dochází k přeměně BA na BAR. Stejně jako EBADI a IRANBAKSHI (2011) jsem potvrdila vliv BA na indukci a iniciaci tuberizace hlíz lilku bramboru, včetně jejího průběhu. Tyto autoři potvrdili, že vyšší koncentrace BA v médiu vede k vyšší tvorbě hlíz. Také GALIS et al. (1995) ve své práci potvrdili příznivý vliv na průběh tuberizace, a že nejvyšší koncentrace jsou dosahovány v době iniciace tvorby hlíz. Druhým nejvíce zastoupeným cytokininem byl iP a iPR, z toho se dá usuzovat, že i tyto cytokininy hrají důležitou roli v průběhu tuberizace. Naopak úplně nejnižší koncentrace endogenního cytokininu byla naměřena pro Z a ZR. Tyto cytokininy pravděpodobně významným podílem tuberizaci neovlivňují. Zeatin a jeho ribosid se běžně používají pro *in vitro* regeneraci bramboru. K zeatinu se ještě přidává BA a sacharóza pro lepší regeneraci prýtů brambor (GHOSH et al. 2015). Byly zjištěny rozdíly mezi skupinami explantátů lišící se délkou kultivace na indukčním médiu. Délka indukce jeden týden nevede k vyšší produkci endogenních cytokininů, v porovnání s délkou indukce devět týdnů. Týdenní indukce je pravděpodobně příliš krátká, aby se mohl vyvolat dostatečný indukční signál. MAL-KAWI et al. (2007) provedli srovnání pěstovaných brambor za indukčních a neindukčních podmínek. V analyzovaných vzorcích jejich práce byly zjištěny následující cytokininy: zeatin ribosid, isopentenyladenin a dále kyselina tuberonová a kyselina jasmonová, včetně jejich metylesterů. Obsah cytokininů se obecně zvýšil za indukčních podmínek.

Obsah dusíku závisí na médiu, na kterém jsou explantáty kultivovány, což se potvrdilo i koncentrace dusíku obsaženém v rostlinném materiálu. V explantátech, u kterých probíhala kultivace na indukčním médiu jeden týden, a potom byly přeneseny na MS médium, byla koncentrace dusíku v médiu i v explantátech vyšší. Kultivace, ve které byly explantáty na indukčním médiu devět týdnů, vedla k postupnému snižování obsahu dusíku jak v médiu, tak v explantátech. Nižší obsah dusíku v médiu, resp. v explantátech, vedl k časnější a intenzivnější tuberizaci. Tento předpoklad potvrdili ve své práci i DONELLY et al. (2003), kteří zjistili, že snížený obsah dusíku v médiu vede k lepší synchronizaci indukce tuberizace a vyšší tvorbě hlíz. CHANG et al. (2016) ve svém pokusu došli k závěru, že snížené množství dusíku vede k lepší a intenzivnější tuberizaci. U explantátů vystavených týdenní indukci byla výraznější stolonizace, a tedy růst vegetativních částí. Tento jev vedl k potlačení tvorby hlíz. Vyšší zásobením explantátů vede k intenzivnějšímu vegetativnímu růstu, a zároveň je potlačena generativní fáze (DOBRANSZKI a TABORI 2010).

Indukce tuberizace a růstu hlíz je polyfaktoriální proces s významným podílem vlivu vnějších faktorů. Na základě výsledku mojí DP lze konstatovat, že je možné tento proces optimalizovat délkou kultivace na indukčním médiu, složením média a podmínkami prostředí. Výsledky verifikují úlohu dusíku, sacharózy, cytokininů a také nezbytnosti optimální délky indukční a morfogenní doby pro produkci hlíz.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá faktory indukce tvorby hlíz lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) v *in vitro* podmínkách. Byly popsány jednotlivé vnější a vnitřní faktory, které se podílejí na průběhu tuberizace a také na dormanci. Dále byly popsány podmínky produkce sadby a její nároky na ní. Jednonodální segmenty lilku bramboru (*Solanum tuberosum L.*) byly kultivovány na indukčním médiu se sníženým obsahem dusíku 12 μmol , 80 g/l sacharózy a s přidavkem 10 mg/l BA. Po indukci byly segmenty přeneseny na MS médium. Byl založen pokus o třech variantách lišící se délkou kultivace na indukčním médiu. Kultivace segmentů a produkce hlíz probíhala v *in vitro* podmínkách. Délka sledování pokusu byla devět týdnů a od čtvrtého týdne byl zaznamenáván počet vytvořených hlíz. Byly stanoveny obsahy fytohormonů, jako je ABA a CK a produkce etylenu, etanu a CO_2 , dále pak obsah dusíku. Obsah endogenní ABA byl stanoven metodou RIA a obsah endogenních CK pomocí HPLC a ELISA. Produkce etylenu byla měřena plynovou chromatografií. Obsah dusíku byl měřen v jednonodálních segmentech lodyh lilku brambor a v médiu spektrofotometricky a pomocí indikačních papírků. Byla vyhodnocena frekvence tuberizace, velikost a hmotnost hlíz mezi jednotlivými skupinami explantátů. Byly vyhotoveny trvalé mikroskopické preparáty zachycující přeměnu axilárního pupenu ve stolon a později v hlízu.

Bylo potvrzeno, že délka kultivace na indukčním médiu se sníženým množstvím anorganického dusíku na 12 μmol , má vliv na zahájení tuberizace a množství vytvořených hlíz. Bylo zjištěno, že obsah ABA souvisí se indukcí tuberizace. Nejvyšší koncentrace byla naměřena ve stolonu ve čtvrtém týdnu, kdy se začínají tvořit první hlízy. Bylo zjištěno, že délka indukce ovlivňuje velikost a hmotnost hlíz. Nejvíce hlíz bylo ve velikostní kategorii 4–6 mm. Obsah etylenu byl nejvyšší u skupiny explantátů s devítitýdenní indukcí, což může souviset s tím, že tyto explantáty nebyly subkultivovány na MS médiu, jako tomu bylo v případě zbylých dvou skupin explantátů. V případě cytokininů byly detekovány mezi jednotlivými skupinami explantátů, ale i mezi jednotlivými typy cytokininů, významné rozdíly. Největší zastoupení měl benzyl adenin, což patrně souvisí s tím, že byl přidán do indukčního média. Podařilo se mi pomocí trvalých mikroskopických preparátů zachytit přeměnu axilárního pupenu ve stolon, resp. v hlízu. V případě dusíku byla koncentrace amonného dusíku nižší

v explantátech a médiu s devítitýdenní indukcí. Obsah nitrátového dusíku byl také nižší v explantátech a médiu s indukcí devět týdnů, oproti explantátům s týdenní indukcí.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ABDALA G., CASTRO G., GUINAZÚ M., TIZIO R., MIERSCH O. (1996): Occurrence of jasmonic acid in organs of *Solanum tuberosum L.* and its effect on tuberization. *Plant Growth Regul.* 19: 139-143. ISSN 0167-6903

AKSENOVA N. P., SERGEEVA L. I., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOVSKAYA S. A., KOLACHEVSKAYA O. O., ROMANOVA G. A. (2013): Regulation of potato tuber dormancy and sprouting. *Russ. J. Plant Physiol.* 60: 301312. ISSN 1021-4437

ALTINDAL D., KARADOĞAN T. (2010): The effect of carbon sources on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Turk. J. Field Crops.* 15 (1): 7-11. ISSN 1301-1111

AMADOR V., BOU J., MARTÍNEZ-GARCIA J., MONTE E., RODRÍGUEZ-FALCON M., RUSSO E., PRAT S. (2001): Regulation of potato tuberization by daylength and gibberellins. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 37-38. ISSN 1365-3040

BANGERTH K. F. (2008): Nature and significance of correlative hormonal signals in growth and development of annual and perennial plants. *Acta Hort.* 774: 379-390. ISSN 0567-7572

BAROJA-FERNÁNDEZ E., AGUIRREOLEA J., MARTÍNKOVÁ H., HANUŠ J., STRNAD M. (2002): Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiol. Bioch.* 40: 217–224. ISSN 0981-9428

BARRIEU P., SIMONNEAU T. (2000): The monoclonal antibody MAC 252 does not react with the (-) enantiomer of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 51: 305–307. ISSN 0022-0957

BETHKE P. C. (2014): Postharvest storage and physiology. In: NAVARRE R. & PAVEK M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi Publishing, s. 255-271. ISSN 0970-8235

BIELESKI R. L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissue. *Anal. Biochem.* (9): 431-442. ISSN 0003-2697

- BLAKESLEE J. J., PEER W. A., MURPHY A. S. (2005): Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 494-500. ISSN 1369-5266
- BRIAN P. W., HEMMING H. G. A RADLEY M. (1955): A physiological comparison of gibberellic acid with some auxins. *Physiol. Plant.* 8 (4): 899-912. ISSN 00319317
- BROADLEY M. R., WHITE P. J., BRYSON R. J., MEACHAM M. C., BOWEN H. C., JOHNSON S. E., HAWKESFORD M. J., MCGRATH S. P., ZHAO F. J., BREWARD N., HARRIMAN M. & TUCKER M. (2006): Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65 (2): 169-181. ISSN 0029-6651
- BROWN C. R., HENFLING J. W. (2014): A History of the potato. In: NAVARRE R. & PAVEK M. J. (eds.): *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi Publishing, s. 1-12. ISSN 0970-8235
- BURTON W. G. (1978): The physics and physiology of storage. In: PAUL M. HARRIS (ed.). *The Potato crop: the scientific basis for improvement*. London: Springer Science Business Media, s. 545-606.
- CARRERA E., BOU J., GARCÍA - MARTÍNEZ J. L., PRAT S. (2000): Changes in GA₂₀ oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J.* 22 (3): 247-256. ISSN 0960-7412
- CLAASSENS M. M. A VREUGDENHIL D. (2000): Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation? *Potato Res.* 43 (4): 347-369. ISSN 00143065
- COLEMAN W. K. & COLEMAN S. E. (2000): Modification of potato microtuber dormancy during induction and growth *in vitro* or *ex vitro*. *Am. J. Potato Res.* 77 (2): 103-110. ISSN 1099-209X
- COLEMAN W. K., DONNELLY D. J., COLEMAN S. E. (2001): Potato microtubers as research tools: A review. *Am. J. Potato Res.* 78 (1): 47-55. ISSN 0003-0589
- CORREA R. M., PINTO J. E. P., PINTO C. A. P., FAQUIN V., REIS E. S., MONTEIRO A. B., DYER W. E. (2008): A comparison of potato seed tuber yields in beds, pots and hydroponic systems. *Sci. Horti-Amsterdam* 116 (1): 17-20. ISSN 0304-4238

- DERMASTIA M., RAVNIKAR M., VILHAR B., KOVAC M. (1994): Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid – treated potato (*Solanum tuberosum*) stem node cultures. *Physiol. Plant.* 92 (2): 241-246. ISSN 0031-9317
- DHITAL S. P., LIM H. T. (2012): Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by supplementary nutrients, plant growth regulators, and *In vitro* culture conditions. *Pot. Res.* 55 (2): 97-108. ISSN 0014-3065
- DIMALLA G. G., VANSTADEN J. (1977): Effect of etylene on endogenous cytokinin and gibberellin levels in tuberizing potatoes. *Plant Physiol.* 60: 218-221. ISSN 0032-0889
- DOBRANSZKI J., TABORI K. M. (2010): Influence of nitrogen supply of potato plantlets on *in vitro* tuberization pattern under inductive and non-inductive conditions. *Potato Res.* 53: 121-127. ISSN 0014-3065
- DONELLY D. J., COLEMAN W. K., COLEMAN S. E. (2003): Potato microtuber production and performance: A review. *Am. J. Potato Res.* 80: 103–115. ISSN 1099-209X
- DRAGICEVIC I., KONJEVIC R., VINTERHALTER B., VINTERHALTER D., NESKOVIC M. (2008): The effects of IAA and tetcyclacis on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot cultures *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 54: 189–193. ISSN 0167-6903
- DURRANT M. J., LOVE B. J. G., MESSEM A. B., DRAYCOTT A. P. (1973): Growth of crop row in relation to soil – monture extraction. *Ann. Appl. Biol.* 74 (3): 387-394.
- EBADI M., IRANBAKSH A. (2011): The induction and growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers (Sante cultivar) in response to the different concentrations of 6-benzylaminopurine and sucrose. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (52): 10626-10635. ISSN 1684-5315
- EWING E. (1995): The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant hormones* 698-724. ISSN 1021-4437
- EWING E. E., STRUIK P. C. (1992): Tuber formation in potato: induction, iniciation and growth. *Horticulture Reviews.* 14: 89-133. ISSN 0163-7851

- FERNIE A. R., WILLMITZER L. (2001): Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol.* 127: 1459–1465. ISSN 0032-0889
- FÍŠEROVÁ H., MIKUŠOVÁ Z., KLEMŠ M. (2008): Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in plants by means. *Plant, Soil and Environment* 54 (2): 55-60. ISSN 1214-1178
- FORSLINE P. L., LANGILLE A. R. (1976): An assessment of the modifying effect of kinetin on *in vitro* tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* 54 (22): 2513-2516. ISSN 0126-0537
- GÁLIS I., MACAS J., VLASÁK J., ONDŘEJ M., VANONCKELEN H. A. (1995): The effect of an elevated cytokinin level using the *ipt* gene and N-6-benzyladenine on single node and intact potato plant tuberization *invitro*. *J. Plant Growth Regul.* 14 (3): 143-150. ISSN 0721-7595
- GAO Y., JIA L., HU B., ALVA A., FAN M. (2014): Potato stolon and tuber growth influenced by nitrogen form. *Plant Prod. Sci.* 17 (2): 138-143. ISSN 1343-943X
- GARNER N., BLAKE J. (1989): The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulativ substances. *Ann. Bot. London.* 63: 663-674. ISSN 0305-7364
- GHOSH S., MAJUMDAR S., SARKAR D., DATTA K. (2015): An efficient adventitious shoot regeneration system for potato (*Solanum tuberosum* L.) using leaf discs. *J. Plant Biochem. Biot.* 24 (3): 298-304. ISSN 0971-7811
- GIBSON G. I. (2005): Control of plant development and gene expression by sugar signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 93-102. ISSN 1369-5266
- GOPAL J., IWAMA K., JITSUYAMA Y. (2008): Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44: 221–228. ISSN 1054-5476
- GREGORY L. E. (1956): Some factors for tuberization in the potato plant. *Am. J. Bot.* 43 (4): 281-288. ISSN 0002-9122

HAINES M. M., SHIEL P. J., FELLMAN J. K. A BERGER P. H. (2003): Abnormalities in growth, development and physiological responses to biotic and abiotic stress in potato (*Solanum tuberosum*) transformed with *Arabidopsis ETR1*. *J. Agric. Sci.* 141 (3-4): 333-347. ISSN 0021-8596

HAJIREZAEI M. R., TAKAHATA Y., TRETHERWEY R. N., WILLMITZER L., SONNEWALD U. (2000): Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. *J. Exp. Bot.* 51: 439-445. ISSN 0022-0957

HANCOCK R. D., MORRIS W. L., DUCREUX L. J. M., MORRIS J. A., USMAN M., VERRALL S. R., FULLER J., SIMPSON C. G., ZHANG R. X., HEDLEY P. E. (2014): Physiological, biochemical and molecular responses of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant to moderately elevated temperature. *Plant Cell Environ.* 37 (2): 439-450. ISSN 1365-3040

HARTMANN A., SENNING M., HEDDEN P., SONNEWALD U. A SONNEWALD S. (2011): Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant Physiol.* 155 (2): 776-796. ISSN 0032-0889

HASSANPANA D., HOSIENZADEH A. A., DAHDAR B., ALLAHYARI N., IMANPARAST L. (2009): Effects of different rates of nitrogen and phosphorus fertilizers on yield and yield components of Savalan potato cultivar mini-tubers. *J. Food Agric. Environ.* 7 (2): 415-418. ISSN 1459-0255

HEMBERG T. (1970): The action of some cytokinins on the rest - period and the content of acid growth - inhibiting substances in potato. *Physiol. Plant.* 23 (4): 850-858. ISSN 0031-9317

HORÁČKOVÁ V., DĚDIČ P., PTÁČEK J. (2008): Biotechnologické postupy při produkci bezvirových materiálů v procesu novošlechtění a udržovacího šlechtění bramboru. *Vědecké práce - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod* 16: 149–155. ISSN 1211-2429

HOUBA M., HOSNEDL V. (2002): *Osivo a sadba: praktické semenářství*. Praha: Martin Sedláček, 186 s. ISBN 80-902413-6-0

CHANG D. C., JIN Y. I., KIM S. J., PARK S. T., CHO Y. R., LEE Y. B. (2016): Nutritional and structural response of potato plants to reduced nitrogen supply in nutrient solution. *Am. J. Potato Res.* 93 (4): 368-377. ISSN: 1099-209X

CHANG D. C., JIN Y. I., KIM S. J., PARK S. T., CHO Y. R., LEE Y. B. (2016): Nutritional and structural response of potato plants to reduced nitrogen supply in nutrient solution. *Am. J. Potato Res.* 93 (4): 368-377. ISSN 1874-9380

CHRISTMANN A., MOES D., HIMMELBACH A., YANG Y., TANG Y., GRILL E. (2006): Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol.* 8: 314–325. ISSN 1435-8603

IRANBAKHSH A., EBADI M., KHANIKI G. B. (2007): The ontogenetic trends of microtuber formation in potato (*Solanum tuberosum L.*). *Pak. J. Biol. Sci.* 10 (6): 843-851. ISSN 1028-8880

JACKSON S. D. (1999): Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiol.* 119: 1–8. ISSN 0032-0889

JACKSON S. D., PRAT S. (1996): Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiol. Plant.* 98 (2): 407-412. ISSN 0031-9317

KAWAKAMI J., IWANA K. (2012): Effect of potato microtuber size on the growth and yield performance of field grown plants. *Plant Pro. Sci.* 15 (2): 144-148. ISSN 1343-943X

KLOOSTERMAN B., BACHEM C. (2014): Tuber development. In: NAVARRE R. A PAVEK M. J. (eds.): *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi publishing, s. 45-63. ISSN 0970-8235

KLOOSTERMAN B., NAVARRO C., BIJSTERBOSCH G., LANGE T., PRAT S., VISSER R. G. F., BACHEM C. W. B. (2007): StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *Plant J.* 52: 362-373. ISSN 0960-7412

KODA Y. (1982): Effects of storage temperature and wounding on cytokinin levels in potato tubers. *Plant Cell Physiol.* 23 (5): 851-857. ISSN 0032-0781

KODA Y., KIKUTA Y. (1991): Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. *Plant Cell Physiol.* 32(5): 629-633. ISSN 0032-0781

KODA Y., KIKUTA Y., TAZAKI H., TSUJINO Y., SAKAMURA S., YOSHIMARA T. (1991): Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry.* 30: 1435-1438. ISSN 0031-9422

KODA Y., OKAZAWA Y. (1983): Characteristic changes in the levels of endogenous plant hormones in relation to the onset of potato tuberization. *Japan. Jour. Crop. Sci.* 52 (4): 592-597. ISSN 0011-1848

KRAUSS A., MARSCHNER H. (1982): Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Pot. Res.* 25: 13–21. ISSN 0014-3065

LOMAX T. L., MUDAY G. K., RUBERY P. H. (1995): Auxin transport. In: DAVIES, MACHÁČKOVÁ I., KONSTANTINOVA T. N., SERGEEVA L. I., LOZHNIKOVA V. N., GOLYANOVSKAYA S. A., DUDKO N. D., EDER J., AKSENOVA N. P. (1998): Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 102 (2): 272-278. ISSN 0031-9317

MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., EDER J., SEIDLOVÁ F., STRNAD M. (1993): Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiol. Plant.* 87, 160-166. ISSN 0031-9317

MALKAWI A., JENSEN B. L., LANGILLE A. R. (2007): Plant hormones isolated from "Katahdin" potato plant tissues and the influence of photoperiod and temperature on their levels in relation to tuber induction. *J. Plant Growth Regul.* 26 (4): 308-317. ISSN 0721-7595

MARKAROV A. M. (1990): Flowering and tuberization patterns in potato plants and effect of red and far-red light on these processes (in Russ.). In: CHAILAKHYAN M. K., MORKONOSOV A. T. (Eds.), Regulation of growth and development in potato plants. Nauka, Moscow, pp. 30-37.

MAUK C. S., LANGILLE A. R. (1978): Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. – *cis*-zeatin riboside in potato plant – its identification and changes in endoge-

nous levels as influenced by temperature and fotoperiod. *Plant Physiol.* 62 (3): 438-442. ISSN 0032-0889

MCGRADY J. J., EWING E. E. (1990): Potato cuttings as models to study maturation and senescence. *Pot. Res.* 33: 97–108. ISSN 0014-3065

MINGO-CASTEL A. M., NEGM F. B., SMITH O. E. (1974): Effect of carbon dioxide and etylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 53 (6): 798-801.

MOORBY J. (1968): Influence of carbohydrate and mineral nutriet supply on growth of potato tubers. *Ann. Bot.* 32 (125): 57-68. ISSN 0305-7364

MORRIS W. L., HANCOCK R. D., DUCREUX L. J. M., MORRIS J. A., USMAN M., VERRALL S. R., SHARMA S. K., BRYAN G., MCNICOL J. W., HEDLEY P. E. (2014): Day length dependent restructuring of the leaf transcriptome and metabolome in potato genotypes with contrasting tuberization phenotypes. *Plant Cell Environ.* 37 (6): 1351-1363. ISSN 0140-7791

MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3): 473-497. ISSN 0031-9317

MUTHONI J., KABIRA J., SHIMELIS H., MELIS R. (2014): Regulation of potato tuber dormancy: A review. *Aust. J. Crop. Sci.* 8 (5): 754-759. ISSN 1835-2707

NAVARRE D., GOYER A., PAYYAVULA R. & HELLMANN H. (2014): Nutritional characteristics of potatoes. In: NAVARRE R. & PAVEK M. J. (eds.). *The potato: botany, production and uses*. Boston: Cabi publishing, s. 310-344. ISSN 0970-8235

NĚMEC B. et al. *Botanická mikrotechnika ČSAV*, Praha, 1962.

NISTOR A., CAMPEANU G., ATANASIU N., CHIRU N., KARACSONYI D. (2010): Influence of potato genotypes on "*in vitro*" production of microtubers. *Rom. Biotech. Lett.* 15 (3): 5317-5324. ISSN 1224-5984

PARK S. W., JEON J. H., KIM H. S., HONG S. J., ASWATH C., JOUNG H. (2009): The effect of size and quality of potato microtubers on quality of seed potatoes in the cultivar 'Superior. *Sci. Hortic-Amsterdam* 120 (1): 127-129. ISSN 0304-4238

- PELACHO A. M., MINGOCATEL A. M. (1991): Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 97(3): 1253-1255. ISSN 0032-0889
- PERL A., AVIV D., WILLMITZER L., GALUN E. (1991): *In vitro* tuberization in transgenic potatoes harboring β -glucuronidase linked to a patatin promoter: effects of sucrose levels and photoperiods. *Plant Sci.* 73 (1): 87-95.
- PIAO X. C., CHAKRABARTY D., HANH E. J., PAEK K. Y. (2003): A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Curr. Sci. India* 84 (8): 1129-1132. ISSN 0011-3891
- QUARRIE S. A., WHITFORD P. N., APPLEFORD N. E. J., WANG T. L., COOK S. K., HENSON L. E., LOVEYS B. R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 183: 330–339. ISSN 0032-0935
- RADOUANI A., LAUER F. I. (2015): Effect of NPK media concentrations on *in vitro* potato tuberization of cultivars Nicola and Russet Burbank. *Am. J. Potato Res.* 92 (2): 294-297. ISSN 1874-9380
- RAPPAPORT L., TIMM H. A LIPPERT L. F. (1958): Gibberellin on white potatoes. *Calif. Agric.* 12 (2): 4-5. ISSN 0008-0845
- RASPOR M., MOTYKA V., ŽIŽKOVÁ E., DOBREV P., TRÁVNÍČKOVÁ A., ZDRAVKOVIČ-KORAČ S., SIMONOVIČ A., NINKOVIČ S., DRAGIČEVIČ I. (2012): Cytokinin profiles of *atckx2*-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. *J. Plant Growth Regul.* 31 (3): 460-470. ISSN 0721-7595
- RITTER E., ANGULO B., RIGA P., HERRAN C., RELLOSO J., SAN JOSE M. (2001): Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Res.* 44 (2): 127-135. ISSN 0014-3065
- ROMANOV G. A., AKSENOVA N. P., KONSTANTINOVA T. N., GOLYANOV-SKAYA S. A., KOSSMANN J., WILLMITZER L. (2000): Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 32: 245–251. ISSN 0167-6903

- ROSS H. A., DAVIES H. V., BURCH L. R., VIOLA R., McRAE D. (1994): Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 90 (4): 748-756.
- ROUMELIOTIS E., KLOOSTERMAN B., OORTWIJN M., KOHLEN W., BOUE-MEESTER H. J., VISSER R. G., BACHEM C. W. (2012). The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *J Exp. Bot.* 63(12): 4539-4547. ISSN 0022-0957
- ROUMELIOTIS E., VISSER R. G., BACHEM C. W. (2012). A crosstalk of auxin and GA during tuber development. *Plant Signal Behav.* 7 (10): 1360-1363. ISSN 1559-2316
- RYKACZEWSKA K. (2015): The effect of high temperature occurring in subsequent stages of plant development on potato yield and tuber physiological defects. *Am. J. Potato Res.* 92 (3): 339-349. ISSN 1874-209X
- RYKACZEWSKA K. (2016): Field performance of potato minitubers produced in aeroponic culture. *Plant Soil Environ.* 62 (11): 522-526. ISSN 1214-1178
- RYLSKI I., RAPPAPORT L. & PRATT H. K. (1974): Dual effects of ethylene on potato dormancy and sprout growth. *Plant Physiol.* 53 (4): 658-662. ISSN 10214437
- SAAB I. N., SHARP R. E., PRITCHARD J., VOETBERG G. S. (1990): Increased endogenous abscisic-acid maintains primary root-growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93: 1329-1336. ISSN 0032-0889
- SALIMI K., AFSHARI R. T., HOSSEINI M. B. A STRUIK P. C. (2010): Effects of gibberellic acid and carbon disulphide on sprouting of potato minitubers. *Sci. Hortic.* 124 (1): 14-18. ISSN 0304-4238
- SARKAR D., PANDEY S. K., SHARMA S. (2006): Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (*Solanum tuberosum*) tuber formation *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org.* 87 (3): 285-295. ISSN 0167-6857
- SARKAR D., PANDEY S. K., SHARMA S. (2010): High K⁺ does not affect potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber induction, but represses its development *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Pl.* 46 (6): 569-577. ISSN 1991-8178

- SHOCK C. C., HOLMES Z. A., STIEBER T. D., ELDREDGE E. P., ZHANG P. (1993): The effect of timed water stress on quality, total solids and reducing sugar content of potatoes. *Am. Potato J.* 70 (3): 227-241. ISSN 0003-0589
- SHOCK C. C., PEREIRA A. B., ELDREDGE E. P. (2007): Irrigation best management practices for potato. *Am. J. Potato Res.* 84 (1): 2937. ISSN 1099-209X
- SONNEWALD U. (2001): Control of potato tuber sprouting. *Trends Plant Sci.* 6 (8): 333-335. ISSN 1360-1385
- SORCE C., LOMBARDI L., GIORGETTI L., PARISI B., RANALLI P., LORENZI, R. (2009): Indoleacetic acid concentration and metabolism changes during bud development in tubers of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *J. Plant Physiol.* 166 (10): 1023-1033. ISSN 0176-1617
- SORCE C., PIAGGESI A., CECCARELLI N., LORENZI Z. (1996): Role and metabolism of abscisic acid in potato tuber dormancy and sprouting. *J. Plant Physiol.* 149 (5): 548-552. ISSN 0176-1617
- STOREY R. M. J. (2007). The harvested crop. In: VREUGDENHIL D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*, Amsterdam: Elsevier, s. 441-470.
- STRNAD M. (1996): Enzyme immunoassays of N 6-benzyladenine and N 6-(*meta*-hydroxybenzyl) adenine cytokinins. *J. Plant Growth Reg.* 15 (4): 179-188. ISSN 0167-6903
- SUTTLE J. (2001): Dormancy-related changes in cytokinin efficacy and metabolism in potato tubers during postharvest storage. *Plant Growth Regul.* 35 (3): 199-206. ISSN 0167-6903
- SUTTLE J. C. & HULTSTRAND J. F. (1994): Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 105 (3): 891-896. ISSN 0032-0889
- SUTTLE J. C. (1995): Postharvest changes in endogenous ABA levels and ABA metabolism in relation to dormancy in potato tubers. *Physiol. Plant.* 95 (2): 233-240. ISSN 0031-9317
- SUTTLE J. C. (1998): Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 118 (3): 843-848. ISSN 1021-4437

- SUTTLE J. C. (2003): Auxin-induced sprout growth inhibition: role of endogenous ethylene. *Am. J. Potato Res.* 80 (5): 303-309. ISSN 1099-209X
- SUTTLE J. C. (2004): Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment. *J. Plant Physiol.* 161 (2): 157-164. ISSN 1021-4437
- SUTTLE J. C. (2007): Dormancy and sprouting. In: VREUGDENHIL D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advanced perspectives*. Amsterdam: Elsevier, s. 287-305.
- SUTTLE J. C. (2008): Effects of synthetic phenylurea and nitroguanidine cytokinins on dormancy break and sprout growth in Russet Burbank minitubers. *Am. J. Potato Res.* 85 (2): 121-128. ISSN 1099-209X
- SUTTLE J. C., ABRAMS S. R., DESTEFANO-BELTRÁN L. & HUCKLE L. L. (2012): Chemical inhibition of potato ABA-8'-hydroxylase activity alters in vitro and in vivo ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration. *J. Exp. Bot.* 63 (15): 5717-5725. ISSN 0022-0957
- ŠIMKOVÁ D., LACHMAN J., HAMOUZ K. A VOKÁL B. (2013): Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food Chem.* 141 (4): 3872-3880. ISSN 0308-8146
- TADESSE M., LOMMEN W. J. M., STRUIK P. C. (2001): Development of micropropagated potato plants over three phases of growth as affected by temperature in different phases. *Neth. J. Agr. Sci.* 49 (1): 53-66. ISSN 0028-2928
- TAKAHASHI K., FUJINO K., KIKUTA Y., KODA Y. (1994): Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. *Plant Sci.* 100 (1): 3-8. ISSN 0168-9452
- THOMPSON B. (1977): *Fundamentals of gas analysis by gas chromatography*. Varrian Assoc. Palo Alto: 64-71. ISSN 1757-5958
- TURNBULL C. G. A HANKE D. E. (1985): The control of bud dormancy in potato tubers. *Planta* 165(3): 359-365. ISSN 0032-0935

- VAN ITTERSUM M. K. & SCHOLTE K. (1992): Shortening dormancy of seed potatoes by storage temperature regimes. *Potato Res.* 35 (4): 389-401. ISSN 0014-3065
- VANDAM J., KOOMAN P. L., STRUIK P. C. (1996): Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L). *Potato Res.* 39 (1): 51-62. ISSN 0014-3065
- VREUGDENHIL D., SERGEEVA L. I. (1999): Gibberellins and tuberization in potato. *Potato Res.* 42 (3-4): 471-481. ISSN 0014-3065
- VREUGDENHIL D., STRUIK P. C. (1989): An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 75: 525-531. ISSN 0031-9317
- VREUGDENHIL D., VanDIJK W. (1989): Effects of ethylene on the tuberization of potato (*Solanum-tuberosum*) cuttings. *Plant Growth Regul.* 8 (1): 31-38. ISSN 0167-6903
- WHITE P. J., BRADSHAW J. E., FINLAY M., DALE B., RAMSAY G., HAMMOND J. P. A BROADLEY M. R. (2009): Relationships between yield and mineral concentrations in potato tubers. *Hort. Sci.* 44 (1): 6-11. ISSN 0018-5345
- WILLS R. B. H., WARTON M. A. & KIM J. K. (2004): Effect of low levels of ethylene on sprouting of potatoes in storage. *Hort. Sci.* 39 (1): 136-137. ISSN 0018-5345
- WOOLFE J. A., POATS S. V. (1987): The potato in the human diet. London: Cambridge University Press. 242 s. ISSN 0028-0836
- WROBEL S. (2014): Assessment of possibilities of microtuber and *in vitro* plantlet seed multiplication in field conditions. Part 1: PVY, PVM and PLRV spreading. *Am. J. Potato Res.* 91 (5): 554-565. ISSN 1099-209X
- WROBEL S. (2015): Assessment of potato microtuber and *in vitro* plantlet seed multiplication in field conditions - growth, development and yield. *Field Crop. Res.* 178: 26-33. ISSN 0378-6852

XU X., VAN LAMMEREN A., VERMEER E., VREUGDENHIL D. (1998): The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol.* 117: 575-584. ISSN 0032-0889

8.1 Internetové zdroje

Požadavky na množitel'ské porosty a sadbu brambor (eAGRI). [online]. Copyright © 2009 [vid. 17. 03. 2017]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100119859.html>

VREUGENHIL, 2007 *Potato biology and biotechnology advances and perspectives* [online] Oxford: Elsevier ISBN 978-0-444-51018-1 [vid. 17. 03. 2017]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780444510181>

9 SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Srovnání frekvence tuberizace (%) mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 2: Srovnání velikosti mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 3: Srovnání hmotnosti hlíz mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 4: Změny v obsahu ABA v jednonodálním segmentu mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 5: Změny v obsahu ABA ve stolonu mezi skupinami explantátů s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 6: Změny v produkci etylenu mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 7: Změny v produkci etanu mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 8: Změny v produkci CO₂ mezi explantáty s rozdílnou délkou kultivace na indukčním médiu.

Graf č. 9 Obsah endogenního iPR v průběhu tuberizace.

Graf č. 10 Obsah endogenního iP v průběhu tuberizace.

Graf č. 11 Obsah endogenního BA v průběhu tuberizace.

Graf č. 12 Obsah endogenního BAR v průběhu tuberizace.

Graf č. 13 Obsah endogenního dHZ v průběhu tuberizace.

Graf č. 14 Obsah endogenního dHZR v průběhu tuberizace.

Graf č. 15 Obsah endogenního mT v průběhu tuberizace.

Graf č. 16 Obsah endogenního mTR v průběhu tuberizace.

Graf č. 17 Obsah endogenního Z v průběhu tuberizace.

Graf č. 18 Obsah amonného dusíku v jednonodálních segmentech lodyh brambor.

Graf č. 19 Obsah amonného dusíku v médiu.

Graf č. 20 Obsah nitrátových iontů v jednonodálních segmentech lodyh bramboru.

Graf č. 21 Obsah nitrátového dusíku v médiu.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Udržování a množení bramboru.

Obrázek č. 2 Udržování a množení bramboru při využití explantátových kultur.

*Obrázek č. 3 Kultura lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v podmínkách *in vitro*.*

Obrázek č. 4 Experiment na stanovení etylenu, etanu a CO₂.

Obrázek č. 5 Jednonodální segment lodyhy lilku bramboru.

*Obrázek č. 6 Stolonzace jednonodálních segmentů stonků lilku bramboru *in vitro*.*

Obrázek č. 7 Tuberizace na stolonu lilku bramboru.

*Obrázek č. 8 Založení kultury jednonodálních segmentů stonků pro produkci hlíz v podmínkách *in vitro*.*

Obrázek č. 9 Počátek stolonzace (prorůstání axilárních pupenů ve stolony).

Obrázek č. 10 Patrná stolonzace a tvorba prvních hlíz.

Obrázek č. 11 Tuberizace na jednonodálních segmentech lodyh lilku bramboru.

Obrázek č. 12 Hlízy po týdenní indukci.

Obrázek č. 13 Hlízy po čtyřtýdenní indukci.

Obrázek č. 14 Hlízy po devítitýdenní indukci.

Obrázek č. 15 Jednonodální segment lodyhy s axilárním pupenem.

Obrázek č. 16 Patrná stolonzace na jednonodálním segmentu lodyhy.

Obrázek č. 17 Jednonodální segment lodyhy s vyvinutějším axilárním pupenem.

Obrázek č. 18 Přeměna stolonu v hlízu.

Obrázek č. 19 Patrná tuberizace jednonodálního segmentu lodyhy.

Obrázek č. 20 Škrobová zrna v parenchymatickém pletivu hlízy.

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA – kyselina abscisová

BA – benzyladenin

BSA – hovězí sérový albumin

CK – cytokininy

ELISA – imunoenzymatická reakce

FLD – fluridon

GA – kyselina gibberelová

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IAA – kyselina indolyl-3-octová

JA – kyselina jasmonová

MS – Murashige & Skoog médium

PCR – polymerázová řetězová reakce

Phy – fytochrom

PNPP – p-nitrofenyl fosfát

RIA – radioimunuanalýza

TBS – Tris pufr

UKZUZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

VÚB – Výzkumný ústav bramborářský