

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská



Bakalářská práce

2017

Marcela Hartingerová

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa



**Mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica*
L.) pomocí *in vitro* metod**

Bakalářská práce

Autor: Marcela Hartingerová

Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Marcela Hartingerová

Lesnictví

Název práce

Mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.) pomocí in vitro metod.

Název anglicky

In vitro micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.)

Cíle práce

Vypracování literární rešerše množení jeřábu oskeruše pomocí in vitro metod. Vyhodnotit vliv auxinů a cytokininů na růst explantátů jeřábu oskeruše. Zaměřit se na růst kultur ve fázi multiplikace, zakořeňování a přesazení do nesterilních podmínek.

Metodika

Získání literárních zdrojů pro vypracování literární rešerše k in vitro pěstování rostlin, zvláště se zaměřením na množení jeřábu oskeruše.

Pěstování kultury jeřábu oskeruše v prostředí in vitro a následné využití sterilní kultury pro vyhodnocení vlivu přídatku auxinů a cytokininů v médiích pro multiplikaci a zakořeňování kultur.

Při sledování vlivu auxinů a cytokininů na in vitro kultury jeřábu, by měl být zvláště hodnocen vliv těchto látek na růst prýtů a kořenů a na přežívání rostlinného materiálu (mortalitu) na médiích.

Doporučený rozsah práce

30-40 stran

Klíčová slova

Rostlinné regulátory růstu, organogeneze, multiplikace, zakořeňování

Doporučené zdroje informací

- Jain S. M., Häggman H., 2007. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer. 569 p. ISBN 978-1-4020-6351-0
- Lall, S., Mandegaran, Z., Roberts, A., 2006. Shoot multiplicacion and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 23-29.
- Lloyd G., McCown G., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by the use of shoot-tip culture. *Combined Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427.
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Karady, M., Novák, O., Mikulík, J., Hauserová, E., Greplová, J., Strnad, M., Doležal, K., 2009. Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *Plant growth regul.*, 28: 341-348.
- Miko, M., Gažo, J., Biroščíková, M., 2004. In vitro klonové množení genetických zdrojů jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica*) na území Slovenska. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 4: 85 – 89.
- Nikolaou, Paraskevas; Zagas, Dimitris; Scaltsoyiannes, Vassilis; et al., 2008. Advances in the micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.). *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (3): 154-157.
- Piagnani, M. C., Zaccheo, P., Crippa, L., 2012. Micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.): role of some factors on in vitro proliferation and rooting, and extra vitro acclimatization. *Agrochimica*, 56 (4-5): 219-233.
-

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 5. 5. 2016

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 27. 1. 2017

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 13. 04. 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Mikropropagace jeřábu skeruše (*Sorbus domestica* L.) pomocí in vitro metod vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 13. dubna

Marcela Hartingerová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Abstrakt

Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) je dlouhověká dřevina, jejíž přirozená regenerace je malá. Pro zachování biologické rozmanitosti lesa se ukázaly technologie mikropropagace *in vitro* jako významný způsob získávání velkého množství reprodukčního rostlinného materiálu v krátkém časovém období. Byla zjišťována koncentrace nejvhodnější pro multiplikaci a zakořeňování rostlinných explantátů. Pro mikropropagaci *in vitro* bylo použito MS médium. Pro multiplikaci bylo médium obohaceno cytokininem BAP a kombinací fytohormonů BAP a IBA v různých koncentracích. Na zakořeňování bylo MS médium obohaceno auxinem IBA a kombinací fytohormonů IBA a NAA v různých koncentracích. Kultivace probíhala 6 týdnů.

Klíčová slova: rostlinné regulátory růstu, organogeneze, multiplikace, zakořeňování

Abstract

Sorbus domestica L. is a long-living tree species whose natural regeneration is small. To preserve the biodiversity of the forest, micropropagation technology in vitro has proven to be an important way of obtaining a large amount of reproductive plant material in a short period of time. The most suitable concentration for the multiplication and rooting of plant explants was found. For in vitro micropropagation, MS medium was used. For multiplication, the medium was enriched with the cytokinin BAP and the combination of phytohormones BAP and IBA in different concentrations. For rooting, the MS medium was enriched with IBA auxin and the combination of phytohormones IBA and NAA at different concentrations. Cultivation took place for 6 weeks.

Keywords: Plant growth regulators, organogenesis, multiplication, rooting

Obsah

1. Úvod	11
2. Cíle práce	12
3. Charakteristika druhu jeřáb oskeruše (<i>Sorbus domestica</i> L.)	13
3.1. Botanické zařazení	13
3.2. Původ a rozšíření	13
3.3. Morfologický popis	15
3.4. Množení dřeviny	16
3.5. Význam a použití	17
3.6. Choroby a škůdci	18
4. Množení v podmínkách in vitro	19
4.1. Zakládání in vitro kultur	20
4.2. Kultivační médium	20
4.3. Růstové regulátory	20
4.4. Převod kultur in vitro do prostředí ex vitro	21
5. Vybavení laboratoře	22
6. Metody a postupy	24
7. Výsledky	27
8. Diskuze	31
11. Závěr	34
12. Seznam literatury a použitých zdrojů	35

Seznam tabulek, obrázků, grafů

tabulka 1	24
tabulka 2	28
tabulka 3	28
obrázek 1	14
obrázek 2	26
obrázek 3	27
obrázek 4	29
obrázek 5	30

Seznam použitých zkratek

BAP - 6 - benzylaminopuryn

IBA - indolyl-3-másečná kyselina

NAA - α -naftyloctová kyselina

BA - 6-benzyladenin

TDZ - thidiazuron

WPN médium - woody plant medium

MS médium - Murashige and Skoog medium

SH médium - Schenk, Hildebrandt

1. Úvod

Reprodukce lesních dřevin *in vitro* umožňuje rozmnožování vybraných jedinců s geneticky cennými vlastnostmi. *In vitro* technologie jsou významné z hlediska šlechtitelství a při záchraně genofondu ohrožených lesních dřevin. Stromy vypěstované *in vitro* mají vlastnosti jako mateřské stromy. Vybrané dřeviny lze namnožit v dostatečném množství v krátkém časovém období. Pro reprodukci lze využít malé části žádané dřeviny. Výhodou je možnost celoročního množení rostlinných kultur.

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.), popsání ekologie dřeviny, možnosti rozmnožování.

Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) se řadí mezi vzácné lesní dřeviny. Jeho dlouhověkost a odolnost proti chorobám a znečištění, ho řadí mezi dřeviny, které jsou z pohledu dlouhodobého udržení budoucího druhového výběru významné.

Mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.) představuje úspěšnou metodu získávání sadebního materiálu této dřeviny vzhledem k jeho špatné přirozené obnově.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše na téma mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.) pomocí in vitro metod.

Popsat druh jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.), ekologické nároky a jeho význam pro lesnictví.

Nastudování téma vlivu auxinů a cytokininů na růst explantátů rodu jeřáb (*Sorbus*) z dostupné vědecké literatury. Navržení testovaných koncentrací auxinů a cytokininů při přípravě živných médií při multiplikaci a zakořeňování.

Zvládnutí praktické stránky laboratorní práce, jako je příprava živného média, jeho sterilizace, pasážování explantátů, apod.

Sledování vlivu auxinů a cytokininů na růst explantátu jeřábu oskeruše při laboratorní kultivaci ve fázi multiplikace, zakořeňování a přesazení do nesterilních podmínek. Hodnocení vlivu auxinů a cytokininů na růst prýtů a kořenů a na přežívání rostlinného materiálu na živných médiích.

3. Charakteristika druhu Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica*)

3.1. Botanické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: růžotvaré (*Rosales*)

Čeleď: růžovité (*Rosaceae*)

Rod: jeřáb (*Sorbus*)

Druh: jeřáb oskeruše (*S. domestica* L.)

Názvy

Jeřáb oskeruše

lat. *Sorbus domestica*

angl. Service tree

německy Speierling

francouzsky Cormier

slovensky Jarabina oskorušová

rusky Рябина домашняя

3.2. Původ a rozšíření

Původnost jeřábu oskeruše na našem území není zcela jistá, někteří dendrologové jej u nás považují pouze za zplanělý druh, jiní uvádějí, že původnost oskeruše na našem území je pravděpodobná. Prvních písemné zmínky o existenci tohoto stromu v Evropě pocházejí z antické doby. Centrum původního výskytu tohoto druhu se nachází v jihovýchodní Evropě, především v oblasti středomoří od Pyrenejí přes Apeniny, Kypr až do Malé Asie po Kavkaz.

V České republice se vyskytuje pouze v nejteplejších oblastech našeho státu, především v Pomoraví a hlavně v Moravském Slovácku až po Zlín. Ojedinelé stromy lze nalézt i ve středních Čechách. Celkem se odhaduje,

že na našem území roste kolem 800 plodících stromů. (Dovrtěl, 2013), (Prudič, 2000)



Obr. 1 Mapa výskytu jeřábu oskeruše

Jeřáb oskeruše je výrazně teplomilným a světlomilným druhem. Snáší vysychavé, živinami dobře zásobené půdy na bazickém geologickém podloží. Vyskytuje se na výhřevných stanovištích šípákových doubrav. (Úradníček a spol. 2009)

Oskeruše je sice teplomilná rostlina vzrostlé stromy jsou značně mrazuvzdorné, vydrží teploty až $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Je odolná také vůči exhalacím. Je možno je vysazovat v průměrných podmínkách nížin a pahorkatin (do 500m). (Žlebčík, 2012)

Vyhýbá se mrazovým kotlinám. (Bakay, 2014)

Je rozeznávána oskeruše polní a lesní. Polní oskeruše bývá maximálně 15-16 m vysoká, avšak její koruna je velmi mohutná a široká. V lesních porostech je oskeruše značně vyšší. (Prudič, 2000)

V lesním prostředí se vyskytuje ojediněle z důvodu nižší konkurenceschopnosti proti ostatním dřevinám a vysokým nárokem na světlo. (Bakay, 2014)

Většina u nás rostoucích oskeruší roste ve starých sadech, vinicích, mnohé stromy zůstaly zachovány ve volné krajině. Jsou to stromy původně pěstované pro užitek z ovoce. S oskeruší se však můžeme setkat i v lesních porostech. V lesích dosahuje tato dřevina výšky až 26 m a výčetního

průměru 66 cm. Nejčastěji ji nacházíme jako výstavek v bývalých pařezinách. (Dovrtěl, 2013)

3.3. Morfologický popis

Habitus

Jeřáb oskeruše je opadavý, listnatý ovocný strom dorůstající výšky 8 - 25 m jako solitér nebo až 30 m v lese.

Kůra zpočátku hladká, šedohnědá, později hrubne v podélně mělce zbrázděnou borku. (Úradníček a spol. 2009)

V našich podmínkách se dožívá 300 až 500 let, v jižní Evropě až 600 let.

Stromy rostoucí mimo lesní porosty mají pravidelnou kulovitou korunu, a proto i výška těchto stromů je nižší, asi 15 m. (Pokorný a kol., 1964) (Dovrtěl, 2013)

Největší výčetní tloušťkou v ČR je 141 cm. Tato oskeruše se nachází ve Strážnické vinici v předhoří Bílých Karpat. (Prudič, 2000)

Dřevina koření třemi až čtyřmi kořeny šikmo dolů. V prvním roce tyto kořeny v závislosti na typu půdy a zásobování vodou mohou dosáhnout délky 50 - 60 cm. (Schmeling, 2000)

Větévky a pupeny

Letorosty jsou přímé, štíhlé, olivově zelené až hnědavé, poseté drobnými, podlouhlými lenticelami. starší větévky jsou světle popelavě šedé, s velkými okrouhlými, rezavými lenticelami. (Pokorný a kol., 1964)

Pupeny jsou střídavé. Vejcovitého tvaru, špičaté, lepkavé. Barvy zelené až načervenalé. (Úradníček a spol. 2009)

Konečný pupen je dvakrát větší než odstávající pupeny postranní. (Pokorný a kol., 1964)

Listy

Listy lichospeřené se zeleným vřetenem, podlouhlé 5-7 cm dlouhé. Po obvodu pilovité. Na spodní straně jsou listy plstnaté. Bílý květ uspořádaný

v chocholičnatých latách, rozkvétá od května do června. (Úradníček a spol. 2009)

Květy

Oboupohlavné bělavé květy uspořádané v chocholičnatých latách rozkvétají od května do června. (Úradníček a spol. 2009)

Květní stopky jsou hustě pýřité; květy mají asi 1,5 cm v průměru. (Pokorný a kol., 1964)

Plody

Plodem je zpravidla hruškovitá malvice, hnědočervená, často i bíle kropenatá 1,5-3 cm velká. (F. Fér a kol., 2005)

V jednom plodu bývají nejčastěji jedno nebo dvě semínka (od 0 do 5), která jsou velmi podobná semínkům jablečným – jsou hnědá, plochá, maximálně 7 mm dlouhá. (Žlebčík, 2012)

Stromy neplodí každý rok. (Dovrtěl, 2013)

Semena musí projít stratifikačním procesem v délce 10 – 12 týdnů.

Hlavní rozlišovací znaky

U starších stromů rozpuká borka. Listy jsou širší než u jeřábu ptačího a jsou do poloviny léta plstnaté. (Pokorný a kol., 1964)

3.4. Množení dřeviny

Plody se sklízí v září a říjnu, když jsou plně vybarvené a dají se lehce rozmáčknout. Dužnina se nechá vykvasit a semena se pak vymyjí. (Bärtels, 1988)

Semena je nutné co nejdříve po dozrání (zhnědnutí) plodu zbavit oplodí, pokud v něm zůstanou delší dobu, rychle ztrácejí klíčivost. Vodou se mechanicky od slupky oddělí dužnina plodu, ta se dále přes síto (oka do 2 mm) proplachuje proudem vody. Oschlá semena je vhodné do doby stratifikace skladovat v uzavřeném obalu v chladničce. (Benedíková, 2009)

Jeřáb oskeruše klíčí po studené a mokré stratifikaci při 4°C, která začíná ihned po sklizni, v 1. roce na 90% (Rohmeder, 1951) - viz (Bärtels, 1988)

Roste později jen velmi zvolna, ale vždy lépe, je-li ve školce pěstován mezi jinými dřevinami, než roste-li v čisté kultuře ve velkém počtu exemplářů, to platí i pro roubovance. Ty se v jižním Německu roubojí na podnožové semenáče hrušní vždy tak, že naroubované jeřáby stojí jednotlivě mezi roubovanci hrušní.

S. domestica se výhradně očkuje na semenáče hrušní, neboť po naroubování roste neuspokojivě.

Očka se musí brát z výhonů, které dosud neukončily růst. Očka ze zdřevnatělých výhonů nepřirůstají. (Bärtels, 1988)

3.5. Význam a použití

Zájem o vtroušené dřeviny vyvolala především nutnost udržet biodiverzitu lesních porostů. (Prudič, 2000)

Oskeruše je ceněná pro své tvrdé, houževnaté dřevo, vhodné na dýhy. (Úradníček a spol. 2009)

Svémi vlastnostmi se řadí ke skupině domácích barevných dřev, kam patří jabloň, hrušeň, břek a je vhodné i pro nábytkářské využití, k výrobě uměleckých předmětů, silně namáhaných nástrojů jako např. hoblíků, různých forem a hudebních nástrojů. U nás však dřevo oskeruše nemá v tomto směru větší hospodářský význam. (Dovrtěl, 2013)

Plody se používají v kuchyni i v léčitelství. Zejména pomáhají při zažívacích obtížích. (Dovrtěl, 2013)

Na jaře v roce 2001 byl v rámci projektu záchrany genofondu této dřeviny na jihovýchodní Moravě založen semenný sad. Tato výsadba o výměře 0,87 ha se nachází v komplexu listnatých lesů na polesí Diváky lesního závodu Židlochovice. Celkem bylo vysazeno 182 kusů roubovanců. Výsadbový materiál byl získán roubováním či očkováním z reprodukčního materiálu vybraného ze 70 matečných stromů. Stromy doposud neplodily. (Dovrtěl, 2013)

V České republice bylo v posledních desetiletích zjištěno několik nových endemických druhů hybridogenního původu. Jedná se o jeřáb manětínský (*S. rhodanthera*), jeřáb džbánský (*S. gemella*), jeřáb olšolistý (*S. albifrons*), jeřáb krasový (*S. eximia*) a jeřáb český (*S. boheamica*). K těmto druhům je možné přiřadit také jeřáb hardeggský (*S. hardeggensis*), který se vyskytuje v Národním parku Podyjí. Hlavní význam všech druhů našich jeřábů spočívá zejména ve zvyšování biologické rozmanitosti naší přírody. (vulhm, 2016)

3.6. Choroby a škůdci

Oskeruše jsou náchylné k různým houbovým onemocněním jako je strupovitost (Hrdoušek a kol., 2014) a sazovitost.

Strupovitost jabloní (*Venturia inaequalis*) způsobuje houba z oddělení Ascomycetes (vřeckovýtrusých). Toto onemocnění se

často projevuje v posledních 5 letech na oskeruších (*Sorbus domestica*). Jeho hlavním hostitelem je však jabloň. Původce (houbová choroba) strupovitosti přezimuje na opadlých napadených listech, z nichž se dostává na rašící pupeny. Z takto napadených částí se pak může druhotně šířit prakticky až do sklizně (do opadu listů).

Šíření a vývoj choroby podporuje deštivé počasí a teploty mezi 17-24°C.

Sazovitost je houbová choroba, projevující se na zrajících nebo sklizených plodech. Mycelium se vyskytuje pouze na povrchu plodu na slupce. Nedochozí k nekrózám ani poškození plodu. (Agromanual)

Tyto houbové choroby se u oskeruší vyskytují v malé koncentraci a výrazně neovlivňují zdravotní stav dřevin.

U lesních stromů je šíření nemocí pomalejší nebo žádné. (Hrdoušek, 2014)

V lesním porostu a v otevřené krajině je hlavním škůdcem zvěř, která okusem ničí mladé stromky. Ochrana spočívá oplocení stromků nebo v použití speciálních nátěrových hmot s repelentní funkcí.

Z hmyzích škůdců byly zaznamenány případy poškození tesaříkem skladištním (*Phymatodes testaceus*) nebo brouky z čeledi lýkohubovitých (Scolicidae). (Hrdoušek, 2014)

4. Množení v podmínkách IN VITRO

Mikropropagace představuje soubor technik IN VITRO, jejíž cílem je rychlé namnožení (naklonování) rostlinného materiálu. V mnoha případech je to jediný možný způsob, jak zachránit silně ohrožené druhy nebo realizovat novošlechtění vysokoprodukčních nebo odolných odrůd (Malá a kol., 2010).

Je možné použít takové orgány nebo jejich části, které klasické vegetativní rozmnožování neumožňuje. S klonováním lze začít v kterémkoliv ročním období, resp. v každém vývojovém období rostliny.

Dalšími výhodami jsou vysoká produktivita rostlinného materiálu stejných jedinců v krátkém časovém období a také možnost ozdravení rostlin od patogenů (Seman a kol., 1990).

Organogeneze

Nejúspěšnější metodou pro mikropropagaci listnatých dřevin je organogeneze (Malá a kol., 2010), kdy se vytvářejí orgány, jako např. kořeny, prýty, listové útvary či generativní orgány. Proces dediferenciace a následné diferenciaci je indukován a udržován podmínkami kultivace. Významnou roli zde hrají rostlinné hormony auxiny, cytokininy, gibbereliny a další. (Havel a kol., 1997)

Při indukci organogeneze jsou hormonálně nastartovány morfogenetické pochody podmiňující diferenciaci pletiv v primárním explantátu. V jejich průběhu se vytvářejí výhony, které se použijí k další multiplikaci nebo k indukci zakořeňování. Po vytvoření kořenového systému a aklimatizaci se kompletní rostliny určené pro výsadbu vysazují na venkovní záhony k dopěstování. Ostatní materiál lze nadále uchovávat v genové bance explantátů pro další namnožení. (J. Malá, 2014)

Z hlediska biotechnologií a jejich využití ve šlechtitelství se rozdělují techniky kultur explantátů do dvou hlavních kategorií:

- techniky zachovávající původní genotyp
- techniky indukce genetické variability, (Seman a kol., 1990)

Explantátové kultury

Představují kultivaci izolovaných rostlinných částí, orgánů, pletiv, buněk, atd. Kultivace rostlin může některé vlastnosti zvýraznit, jiné naopak potlačit. Chování kultury závisí na kultivačních podmínkách a jednotlivé typy kultur se od sebe odlišují metodickou náročností při zakládání. (Havel a kol., 1997)

4.1. Zakládání in vitro kultur

Fáze mikropropagace

Sterilizace

Klíčení

Produkce vzrostlých vrcholů

Kořenění

4.2. Kultivační médium

Je exogenním zdrojem rostlinných hormonů. Významnou součástí média jsou minerální živiny, to jest makroprvky a mikroprvky, a organické látky, především cukry, jako zdroj energie a uhlíku a důležitý faktor ovlivňující osmotickou hodnotu média, vitamíny a aminokyseliny a případně i další speciální organické látky. Postup pro přípravu kultivačních médií je součástí všech základních příruček o explantátových kulturách. (Havel a kol., 1997)

4.3. Růstové regulátory

Se většinou nepřidávají do připravovaného média přímou navázkou, ale pomocí zásobních roztoků. Ty mohou být uchovávány při snížené teplotě, obvykle okolo 4 °C, přičemž pro uchování plné aktivity je doporučována u celé řady látek (např. IAA, IBA, ABA) teplota 0 °C. Kritickým bodem pro aktivitu růstových regulátorů je sterilizace (autoklávováním - 120 °C). Biologickou aktivitu při sterilizaci neztrácí např. NAA, částečně ji ztrácí např. IBA, a některé látky ji ztrácí úplně. Při skladování kultivačních médií

je zapotřebí dodržet podmínky pro uložení zásobních roztoků, tedy dbát na sníženou teplotu a tmu. V zásobních roztocích totiž může docházet k nežádoucím chemickým interakcím s ostatními složkami živného média. (Havel a kol., 1997)

Auxiny

Auxin je nejdéle známým rostlinným hormonem. Má vliv na prodlužující se růst rostlinných buněk. Přítomnost auxinů v kultivačním médiu je nezbytná pro indukci kalusu.

Mezi přírodní auxiny patří např. kys. indolyl-3-octová (IAA) nebo kys. indolyl- 3-máselná (IBA). Kyselina α -naftyloctová (NAA) je auxin syntetický.

Auxin je syntetizován nejen ve vrcholu prýtu, ale i mladých listech , květních orgánech, vyvíjejících se plodech a také v semenech.

Vyšší koncentrace (10^{-7} až 10^{-5} mol/l) růst inhibují, často kvůli zvýšené tvorbě etylénu. (Macháčková a kol., 1997)

Cytokininy

V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů, např. zeatin.

Z biologických účinků cytokininů jsou důležité:

1. stimulace větvení stonků a odnožování rostlin při potlačení dominance apikálního pupene
2. zpomalení stárnutí rostlinných pletiv a orgánů
3. stimulace vývoje plastidů, tvorby chlorofylu a škrobu
4. zvýšení rezistence rostlin proti stresu
5. iniciaci tvorby semen (Kamínek a kol., 1997)

4.4. Převod kultur IN VITRO do prostředí EX VITRO

Přenos rostlin do nesterilních podmínek a jejich dopěstování v půdě.

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují do podmínek ex vitro.

Tyto rostliny jsou zchoulostivělé nanoklimatem uvnitř kultivační skleníčky.

Zakořeňování mikrořízků je všeobecně nejslabším článkem mikro-propagace. Obvyklou praxí je převedení kultur in vitro na sterilní zakořeňovací kultury. Ty obsahují některý z auxinů (ponejvíce IBA) a někdy i další substance, jako je aktivní uhlí rozptýlený v agarovém médiu aj. (Prknová, 2009)

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů. Aby se předcházelo šokovému odumírání velké části sazenic, je třeba o rostliny před transferem do půdy, nebo bezprostředně po něm, pečovat.

Nejčastěji se přesazují do uzavíratelných PE kontejnerů (250 ml) na 2-3 cm vrstvu perlitu, navlhčeného běžnou pitnou vodou, očištěné od kultivačního média. Kontejnery jsou uzavřeny s ponecháním drobných průduchů pro výměnu vzduchu. (Sedlák a kol., 2016)

Stresové faktory, které ovlivňují vitalitu rostlin po převodu do přirozených podmínek je přímé sluneční světlo, vzdušná vlhkost a plně autotrofní výživa. (Košťál, 2015)

5. Vybavení laboratoře

Pro produkci rostlin IN VITRO je třeba mít k dispozici laboratoř, obsahující laboratorní váhy, p-H metr, chladničku a mikrovlnou troubu. Pro sterilizaci živných médií je potřeba sterilizační zařízení, dosahující teploty nejméně 120 °C, například parní tlakový autokláv. Pro sterilizaci pracovních nástrojů (skalpely, pinzety, nůžky, skleněné petriho misky) je vhodná horkovzdušná sušárna, která využívá působení suchého horkého vzduchu při stanovených parametrech teploty a času.

Pro přípravu zásobních roztoků a médií jsou nutné odměrné válce, kádinky, pipety, atd.

Příprava media vyžaduje pečlivé zvážení hormony a vitamíny na miligramy, méně citlivé měřítko lze použít pro vážení agarů a sacharidů. Chladnička s médii v umístěná v laboratoři je nezbytná pro ukládání

zásobních roztoků a chemických látek, které degradují při teplotě místnosti. Zdroj tepla šetří čas k rozpuštění anorganických činidel. Buď pH metr nebo indikátor pH papír je nutný pro seřízení konečné hodnoty pH média. V laboratoři je potřeba destilovaná voda k přípravě médií. zařízení pro steriliza. (Dodds, 1985)

Pro práci v antiseptickém prostředí se používá Flow box. Zde se provádí pasážování a přenos in vitro kultur na čerstvá média. Zařízení flowboxu filtruje vzduch pomocí předfiltrů a HEPA filtrů („high efficiency particulate arrestance“ - „zachytávání mikročástic s vysokou účinností“). Tento typ vzduchového filtru je schopen ze vzduchu s minimálně 99,995% účinností odstranit částice o velikosti 0.1-0.2 μm (výrobce - <http://www.euroclonogroup.it>). Částice této velikosti jsou pro HEPA filtry nejobtížněji filtrovatelné. Větší částice jsou filtrovány s ještě vyšší účinností.

Při práci se sterilním rostlinným materiálem jsou nutné skalpely, pinzety, skleněné petriho misky a nůžky. Jako kultivační nádoby používáme Erlenmeyerovy baňky nebo sklenice 210ml. Sklenice jsou uzavíratelné sterilizovatelným transparentním víčkem nebo pro účely IN VITRO kultivace speciálně vyvinutá plastová víčka.

Rostlinné explantáty se pěstují v regulovaném prostředí. Po přenosu rostlinného explantátu na kultivační médium, jsou kultivační nádoby umístěny do růstové komory se stabilní teplotou (22 - 24 stupňů Celsia) a pravidelnou délkou osvětlení (světlostní doba 16 hodin a temno 8 hodin).

Optimální podmínky pro životní prostředí se budou lišit v závislosti na druhu a účelu experimentu. Pozornost je třeba věnovat kolísání denních teplot, intenzity světla, světla kvality a fotoperiod (relativní délka světla a tmy).

Vyřazené kultury, stejně jako ty kontaminované, se krátce v autoklávu

sterilizují, aby se zkapalnit agar a zničily všechny nečistoty, které mohou být přítomny. Kultura ve skle je snadnější na mytí po zkapalnění média a jeho odstraňování. (Dodds, 1985)

6. Metody a postupy

Příprava rostlinného materiálu

Jednotlivé pupeny se sterilizují v 1% roztoku chlornanu sodného (Savo, Biochemie ČR) a třikrát se promyjí destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí laminárních boxů se odstraní vnější šupiny pupenů a vzrostné vrcholy jsou umístěny na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100 ml baňce). (Malá a kol., 2011)

Pro primární multiplikaci byly použity explantáty jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.) získané od Ing. Jana Vítámvás Ph.D. Ty byly multiplikovány na MS médiu doplněným cytokininem BAP v množství 1mg/l a pasážovány každé 3-4 týdny.

Příprava kultivačního média

Pro kultivaci jeřábu bylo použito MS médium (Murashige a Skoog, 1962).

Složení MS média	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA.2H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O	65,1
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
KI	0,8
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25

CuSO ₄ 5H ₂ O	0,02
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,02
Thiamine HCl	1
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
myo-Inositol	100
Casein	100
L-Glutamine	100
Glycin	2,0
sacharóza	30 g
pH	5,8
agar	8 g

tabulka 1

Před začátkem práce s explantáty je nutno celý laminární box vydezinfikovat, např. roztokem etanolu. Poté se zapnou vzduchové filtry lam. boxu, aby možnost kontaminace byla co nejmenší.

Pro přípravu jednoho litru média se do válce (1litr) odměřily makroelementy, mikroelementy, železo, vitamíny a sacharóza a regulátory růstu.

MS médium obohaceno bylo pro 1. multiplikaci cytokininem BAP v koncentracích 0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l a pro 2. multiplikaci cytokininem BAP a auxinem IBA v koncentracích 1 mg/l BAP + 0,2; 0,5; 1 mg/l IBA a 2 mg/l BAP + 1; 2 mg/l IBA.

Zakořeňování bylo zjišťováno přidáním auxinu IBA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l) a auxinů IBA a NAA (2 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; 2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA) do MS média.

Změřeno pH roztoku na 5,8. Hodnotu pH lze regulovat pomocí KOH (hydroxid draselný).

Médium je zpevněno 8 g agaru.

Do množství 1 litru je doplněno destilovanou vodou. Takto připravené médium je umístěno do mikrovlnné trouby a ohřáto na teplotu varu. Tato teplota je důležitá pro důkladné rozpuštění agarů v roztoku.

Připravené médium je nalito do sklenic s obsahem 210 ml. Do každé sklenice je nalito přibližně 30 ml média. Po pečlivém uzavření sterilizujeme v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 20 min.

Sterilizované médium ve sklenicích bylo použito následující týden. Za tuto dobu lze opticky zjistit případné vady média, např. kontaminace plísní.

K založení kultury pro multiplikaci byly použity nodální pupeny a pro zakořeňování apikální vrcholy již namnožených kultur.

Explantáty tvořené nodálními pupeny byly tvořeny jedním pupenem, který přiléhal na asi 2 mm dlouhý prýt. Apikální vrcholy byly tvořeny přibližně 5 mm dlouhým prýtem. Do jedné sklenice byly vloženy vždy tři rostlinné segmenty. Proběhla sterilizace obvodu skleničky a vnitřní strany víčka nad kahanem.

Kultury byly uloženy do kultivační místnosti na dobu 6 týdnů.



Obr. 2 Multiplikované explantáty

7. Výsledky

Základní rostlinný materiál k pokusu byl získán od vedoucího bakalářské práce Ing. Jan Vítamvás Ph.D, který byl několikrát multiplikován.

Pasážování probíhalo v laboratoři v laminárním boxu. K pasážování byly použity sterilní Petriho misky, pinzety, nůžky. Sterilizace laboratorních pomůcek probíhala v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 120°C. Kahan a lahvička s líhem pro okamžitou sterilizaci pinzety a nůžek byly umístěny v laminárním boxu.

Rostlinný explantát byl v laminárním boxu vyjmut pomocí pinzety z kultivační skleničky na Petriho misku. Po odstranění listů byl explantát roztrhán na dílky o velikosti přibližně 1-1,5 cm. Pinzetou vložen do sterilní skleničky s čerstvým MS médiem. V jedné skleničce byly vždy 3 nové explantáty.

Poté byly přeneseny do kultivační místnosti. Zde byly uloženy po dobu 6 týdnů s řízeným teplotním (22°C) a světlostním režimem (světlo 16hod./tma 8hod.).

Multiplikace

Na multiplikaci byly použity nodální pupeny (Obr. 3)



Obr. 3 Založená kultura - nodální pupeny

Tabulka 2) Vliv cytokininu BAP na délku stonků a počet listů

Množství fytohormonů [mg/l]	Průměrný délka stonku [cm]	Průměrný počet listů [ks]
0 BAP	0,60 ± 0,10a	0,40 ± 0,10d
0,2 BAP	8,80 ± 1,18b	4,04 ± 0,41e
0,5 BAP	8,12 ± 1,13b	3,92 ± 0,43e
1 BAP	12,96 ± 1,53bc	6,16 ± 0,45f
2 BAP	14,24 ± 1,15c	6,80 ± 0,42f

U hodnot se stejnými písmeny neexistuje statisticky významný rozdíl; podle Tukeyova HSD testu (P = 0,05). Hodnoty jsou průměrem 25 vzorků ± SE. (df = 124)

Tabulka 3) Vliv cytokininu BAP a auxinu IBA na délku stonků a počet listů

Množství fytohormonů [mg/l]	Průměrný délka stonku [cm]	Průměrný počet listů [ks]
0 BAP	0,60 ± 0,10a	0,40 ± 0,10f
1 BAP + 0,2 IBA	11,36 ± 5,27b	6,80 ± 0,56g
1 BAP + 0,5 IBA	9,32 ± 5,31bc	5,12 ± 0,31gh
1 BAP + 1 IBA	11,28 ± 4,76bcd	4,88 ± 0,21hi
2 BAP + 1 IBA	9,76 ± 5,41bcde	4,84 ± 0,39hij
2 BAP + 2 IBA	9,36 ± 6,48bcde	3,80 ± 0,39hij

U hodnot se stejnými písmeny neexistuje statisticky významný rozdíl; podle Tukeyova HSD testu (P = 0,05). Hodnoty jsou průměrem 25 vzorků ± SE. (df = 149)

Multiplikační médium MS s přidáními koncentracemi cytokininu BAP

(tab. 2)

Průměrný přírůst explantátů se zvyšuje s vyšší koncentrací fytohormonu BAP. Koncentrací, při které rostliny nejlépe přirůstaly, se jeví 2 mg/l BAP, kdy průměrná délka prýtu byla 14,24 mm a průměrný počet lístků 6,8.

Multiplikační médium MS s přidáním cytokininem BAP a auxinem IBA (tab. 3)

Nejdelší průměrné přírůsty byly získány kombinací fytohormonů 1mg/l BAP a 0,2mg/l IBA.



Obr. 4 Prýty jeřábu oskeruše po 6 týdenní kultivaci

Na tomto médiu byly zjištěny nejvyšší průměry délky prýtu 11,36 mm a nejvyšší průměrný počet listů 6,8.

Statistické analýzy

Jednovýběrovou analýzou rozptylu (ANOVA) bylo zjišťováno, zda jsou průměry jednotlivých výsledků rozdílné vlivem různých středních hodnot příslušných médií, nebo lze rozdíly mezi průměry přičíst náhodnému kolísání. (Drápela, 2003)

Všechna data byla podrobena statistické analýze rozptylu (jednovýběrová analýza rozptylu; ANOVA). Data byla zpracována v programu SPSS Statistics (společnost IBM Analytics; verze 24). Jsou srovnány zjištěné hodnoty F kritické hodnoty F stanovenou z tabulek. Kritická hodnota F je funkcí stupňů volnosti čitatele a jmenovatele a hladině významnosti (α).

Nulová hypotéza při jednoduchém třídění je:

H_0 : všechny rozptyly testovaných koncentrací jsou stejné

$H_0: m_1 = m_2 = m_3 = m_4 = m_5$

H_1 : ne všechny rozptyly testovaných koncentrací jsou stejné (tj. alespoň jedna ze středních hodnoty se liší od ostatních).

Jestliže $F \geq F_{krit.}$, nulová hypotéza je zamítnuta.

Zakořeňování

Na zakořeňování explantátů bylo použito MS médium

s auxinem IBA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l)

a kombinace fytoformonů IBA a NAA (2 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA;

2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA).

Oba pokusy dopadly neúspěšně.

V prvním případě (IBA) rostliny nevytvořily žádné kořeny. Barva byla světle zelená, se známkami počínajícího stárnutí.

V druhém případě (IBA + NAA) část čistého sterilního média zkontaminovala, přičemž bylo celé množství sterilizováno ve stejný okamžik. Do zbývajících čistého sterilního média byly pasážovány apikální vrcholy namnožených rostlin. Po 6 týdnech kultivace bylo pouze 30% explantátů s koncentrací 2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA bez kontaminace (Obr. 5).

Rostliny vykazovaly přírůst, ale nekořenily. Měly tmavě zelenou barvu.



Obr. 5 Explantáty 2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA

7. Diskuze

Bakalářská práce byla zaměřena na vliv cytokininů a auxinů na růst explantátů jeřábu oskeruše.

Pokusy probíhaly v laboratoři IN VITRO kultur, která se nachází ve výukovém prostoru Truba při Arboretu FLD Kostelec nad Černými lesy.

Pokusný materiál byl získán od Ing. Jana Vítámvás. Ph.D. Tento materiál byl pasážován na 11 čerstvých MS médií s 1 mg/l BAP.

Pro zjišťování vlivu cytokininů na multiplikaci bylo použito MS médium, které bylo doplněno cytokininem BAP v koncentracích 0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l.

Pro další pokusnou multiplikaci jsem použila MS médium, které bylo doplněno cytokininem BAP a auxinem IBA s koncentracemi 1 mg/l BAP + 0,2; 0,5; 1 mg/l IBA a koncentrace 2 mg/l BAP + 1; 2 mg/l IBA.

Jedno pokusné MS médium jsem nechala bez auxinů i cytokininů.

Pro všechny koncentrace jsem připravila 25 explantátových kultur, pro multiplikační růst to byly nodální pupeny a pro zakořeňování apikální vrcholy. Kultivace probíhala 6 týdnů.

U multiplikačního růstu bylo provedeno měření délky prýtů a spočítáno množství listů.

Chalupa (2002) uvádí rychlý růst a proliferace prýtů explantátů nejlépe na MS médiu, které obsahovalo nízkou koncentraci cytokininu (BA, TDZ) a auxinu (IBA). Se stoupající koncentrací BA (0,2–1,0 mg/l) v živném médiu stoupal počet vytvořených prýtů, jejich délka však klesala. MS médium obsahující nízké koncentrace BA (0,2–0,4 mg/l) a IBA (0,1–0,2 mg/l) stimulovalo efektivně vytváření a prodlužování nových prýtů.

Podle provedených pokusu postačuje pouze cytokinin BAP. Kultury dobře rostou. Auxiny při organogenezi působí vždy podle poměru vůči cytokininům. Podporují apikální dominanci, kdežto při dominanci

cytokininů je apikální dominance potlačován a z adventivních pupenů zakládaných vnitř pletiv vzniká více stejně disponovaných výhonků. A právě to je cílem multiplikačních subkultur pro produkci mikrořízků. (Prknová, 2009)

Podle “Certifikované metodiky” (Malá a kol., 2011) se k indukci organogeneze u jeřábu oskeruše používá modifikované médium MS s koncentrací fytohormonů BAP 0,2 mg/l a IBA 0,1 mg/l a s koncentrací glutaminu a kaseinového hydrolyzátu 200 mg/l sacharóza v koncentraci 30 g/l, agar 6 g/l, pH se upravuje na hodnotu 5,8. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24°C, 16 hodinové světelné fotoperiodě. Indukce axilárních případně adventivních pupenů na primárním explantátu trvá přibližně 4 – 6 týdnů.

Přidání fytohormonu BAP do MS média je nezbytné pro podporu růstu explantátů. Nižší koncentrace BAP (0 - 0,2 mg/l) dostatečné pouze pro udržení explantátů bez výrazného rozdílu v počtu výhonků, a to bez použití fytohormonu IBA. (Marqueze a kol., 2013)

Další část pokusu byla zaměřena na zakořenění explantátů jeřábu oskeruše. Pro zjišťování vlivu auxinů na zakořeňování jsem použila MS médium, které bylo doplněno auxinem IBA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l) a MS médium doplněné fytohormony IBA a NAA (2 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA; 2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA).

Explantátové kultury na MS médiu s přidáním auxinu IBA byly po 6 týdnech bez kořenů, světle zelené barvy, která byla způsobena počínajícím stárnutím rostlin.

Ani pokus s kulturami na MS médiu s přidáním IBA a NAA se nepodařilo vyhodnotit, protože došlo ke kontaminaci. Nejprve části sterilního média a později již založených kultur. Zbylo 9 explantátů s koncentrací 2 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA, které měly zelenou barvu a nejevily známky stárnutí, ale

nekořenily. Špatná volba média byla zřejmě jedním z důvodů neúspěchu.

Vytváření kořenů u prýtů vypěstovaných *in vitro* bylo stimulováno na agarovém WPM (poloviční koncentrace), obsahujícím nízké koncentrace auxinu (IBA, NAA). Adventivní kořeny se začaly vytvářet na bázi prýtů po přesazení do vhodného živného média. (Chalupa, 2002)

Mauelová a kol. (2004) stimulovala kořeny jeřábu ptačího pomocí IBA (0,1, 0,2, 1,0 mg/l) a NAA (0,2, 0,4 mg/l). Z testovaných koncentrací BAP byl rychlý růst a proliferace prýtů nejlépe stimulovány na MS médiu na hladině BAP 0,8 mg/l a IBA 0,2 mg/l. Kořenů byly nejlépe tvořeny na WPM médiu s koncentrací IBA 1,0 mg/l a NAA 0,4 mg/l. Na takto obohaceném médiu byly mikrořízky ponechány po dobu potřebnou k vytvoření základů adventivních kořenů. Dále byly mikrořízky kultivovány na WPM médiu obohaceném o IBA v koncentraci 0,1 mg/l. Při daném postupu bylo dosaženo během 3 - 4 týdnů 85% úspěšnosti zakořenění.

Malá a kol. (2011) pro zakořeňování jeřábu oskeruše používá MS médium s agarem a třetinovou koncentrací mikro a makroprvků. V první fázi je do agarového média přidán auxin NAA (14 mg/l) a pro zvýšení účinnosti probíhá zakořeňování ve tmě. po dobu 7 dní. Následuje pasážování opět do média MS s agarem a třetinovou koncentrací mikro a makroprvků bez doplnění fytohomonu. Zakořeňování již v této fázi probíhá na světle za stejných kultivačních podmínek jako multiplikace. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 4–6 týdnů u 70–80 % mikrořízků.

Marquez a kol. (2013) pro zakořeňování jeřábu břeku používá vyšší koncentrace IBA v agarovém médiu v průběhu dvou až tří dnů a přímým převodem na přírodní substrát pro ex vitro.

Jeřáb oskeruše je pravděpodobně dosti adaptibilní, neboť roste i na médiu jiného složení, na modifikovaném SH-médiu (Arrillaga a kol., 1991).

Prknová (2008) se zabývala růstem jeřábu oskeruše na tekutém médiu s pískovým nosičem. Pro dřeviny se často lépe osvědčuje jen poloviční koncentrace minerálních složek média, při zachování normálního obsahu organických složek. Zjistila, že i po dlouhodobé konzervaci, trvající 22 týdnů, byl rostlinný materiál vitální ze 71 % na 1/2 MS médiu.

Také zjistila, že v případě jeřábu oskeruše stačí aciditu nastavit jen přibližně do oblasti pH 5,7–7,2.

8. Závěr

Jeřáb oskeruše je teplomilná dřevina, která se vyskytuje pouze v nejteplejších oblastech České republiky, na živiny bohatých půdách, na jihovýchodní Moravě od Pálavských vrchů k Vizovické vrchovině. V Čechách se nachází v Českém středohoří.

Jeho odolnost proti exhalacím a smogu z něho činí dřevinu se širokým použitím.

Pro nízkou schopnost přirozené obnovy jsou předmětem studií možnosti jeho vegetativní reprodukce.

Mikropropagací jeřábu oskeruše se zajistí dostatek sadebního materiálu z výběrových stromů za relativně krátké období.

Klonové množení *in vitro* nepškozuje dárcovský strom. Rozvoj biotechnologií umožňuje zmnožení ohrožených a elitních dřevin se zachováním vlastností matečné dřeviny, případně vyšlechtěním odrůd odolným k chorobám v kratší době vzhledem k dlouhověkosti dřevin, záchraně genofondu ohrožených lesních dřevin, uchování reprodukčního materiálu v bance osiva a explantátů, zakládání semenných sadů.

Možnost kultivovat rostliny *in vitro* souvisí s jejich reprodukční schopností. Důležitou roli při tom mají rostlinné hormony, nejčastěji auxiny a cytokininy.

Pro množení listnatých dřevin je nejvíce používáno MS médium, často modifikované. Médium představuje zdroj energie, výživy a regulačních látek. Dále kultivační podmínky ovlivňuje intenzita a kvalita světla, teplota a fotoperioda. V uzavřeném prostředí kultivační sklenice vznikají plyny, např. vodní pára, které mají vliv na vodní režim explantátů. Rostliny přivyklé na vysokou vlhkost mívají problém s nedostatkem vlhkosti při převodu do podmínek ex vitro.

9. Seznam literatury a použitých zdrojů

Agromanual, [online], [cit. 2017-3-6]

<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/sazovitost>,

<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/strupovitost-jablone-nejvaznejsi-choroba-jablek>,

Bakay Ladislav: Rozšíření jarabiny oskorušovej na Slovensku, [online], 2014, 28, 3, [cit. 2017-2-16]

https://www.researchgate.net/profile/Ladislav_Bakay/publication/267103278_Rozsirenie_jarabiny_oskorusovej_na_Slovensku/links/5446045e0cf2d62c304d8ce1.pdf

Bartel, Andreas: Rozmnožování dřevin, 1. vydání, Státní zemědělské nakladatelství ve sbírce Rostlinná výroba, 1988, 452s., 07-021-88

Benedíková, Marie; Kyseláková, Jolana: Záchrana genofondu jeřábu břeku a oskeruše. Lesnická práce [online], 2005, 84, 9, [cit. 2016-10-3]

<http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-84-2005/lesnicka-prace-c-9-05/zachrana-genofondu-jerabu-breku-a-oskeruse>

Boublík, Z.: Stromem roku 2013 je jeřáb, [online], 2013, Lesy ČR, s.p., [cit. 2017-3-6], <http://www.lesaktualne.cz/aktuality/stromem-roku-2013-je-jerab#more-3681>

Dodds, John H.; Roberts, Lorin W.: Experiments in Plant Tissue Culture, Cambridge University Press 1985, 232s, ISBN 0 521 31516 6 paperback

Fér, František; Alexandr, Pavel: Rozlišovací znaky dřevin, 2005, vydala Česká unie soudních znalců v lesním hospodářství, 85s.

Jain, Shri Mohan; Häggman, Hely: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, Springer, 2007, 569 s., ISBN 978-1-4020-6351-0

Hrdoušek, Vít; Špíšek, Zdeněk; Kršk, Boris; Šedivá, ; Bakay ,Ladislav: Oskeruše strom pro novou Evropu, 2014, Petr Brázda-vydavatelství ve spolupráci s MAS Strážnicko, 240 s., [cit. 2016-7-6], ISBN: 978-80-87387-28-3

Chalupa Vladimír: Růst lesních stromů vypěstovaných in vitro z orgánových kultur a ze somatických embryí. Lesnická práce [online], 2000, 79, 11 [cit. 2016-10-19]
<http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-79-2000/lesnicka-prace-c-11-00/rust-lesnich-stromu-vypestovanych-in-vitro-z-organovych-kultur-a-ze-somatickych-embryi>

Košťál, Jan: Detekce stresu při převodu modelových vyšších rostlin z in vitro do ex vitro prostředí prostřednictvím indukčně-fluorescenčních zobrazovacích metod, 2015 - Diplomová práce, [online], [cit. 2017-3-1]
http://is.muni.cz/th/356893/prif_m/DP-Kostal-356893-archiv.pdf

Malá, J.; Máchová, P.; Cvrčková, H.; Karady, M.; Novák, O.; Mikulík, J.; Hauserová, E.; greplová, J.; Strnad, M.; Doležal, K.: Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis, 2009, Springer, 341-348 s.

Malá, Jana; Máchová, Pavlína; Cvrčková, Helena; Šíma, Petr: Biotechnologie v lesním hospodářství a šlechtění. Lesnická práce [online], 2010, 89, 8 [cit. 2016-9-13]

<http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-89-2010/lesnicka-prace-c-8-10/biotechnologie-v-lesnim-hospodarstvi-a-slechteni>

Malá, Jana; Cvrčková, Helena; Máchová, Pavlína; Dostál, Jaroslav: Mikropropagace jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.) - certifikovaná metodika, 2011, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i Strnady, 18 s., [cit. 2016-9-3], ISBN 978-80-7417-047-8

Marques, S. L.; Canhoto, J.: Micropropagation of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz: Hormonal Effects during Multiplication and Rooting Phases, 2013, [cit. 2016-9-26]

Mauelová, M.; Vítámvás, J.; Tušek, Z.: Rozmnožování významných druhů listnatých stromů technikami *in vitro*, 2004, Krajina, les a lesní hospodářství, FLE ČZU v Praze

Lall, S.; Mandegaran, Z.; Roberts, A.: Shoot multiplication and adventitious regeneration in *sorbus aucuparia*, 2006, Springer, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85; 23-29

Piagnani, M. C.; Zaccheo, P.; Crippa, L.: Micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.): role of some factors on *in vitro* proliferation and rooting, and extra *vitro* acclimatization, 2012, Agrochemical, 219- 233,

Pokorný, Jaromír; Fér, František: Listnáče lesů a parků, 1964, 1. vyd, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 124 s.; 07-041-64-04/40

Prknová, Hana; Kobliha, Jaroslav; Klápště, Jaroslav: Mikropropagace klonů lesních dřevin-termíny důležité fenomény na fotografických

dokumentech, 2007, ČZU FLD 2007, Praha, (Vypracováno dle projektu č. 124/2007 z grantu FRVŠ.), [online], [cit. 2016-11-23]
fzp.czu.cz/~exkurze/_dokumenty/Multimedialni.../minilexikon.pdf

Prknová Hana: Rozmnožování vybraných druhů dřevin in vitro, 2008,
Dizertační práce, [online], [cit. 2016-11-19]
<https://www.fld.czu.cz/dl/46943?lang=cs>

Procházka, Stanislav; Šebánek, Jiří a kolektiv autorů: Regulátory rostlinného růstu, 1. vydání Praha: Academia, 1997, 395s,
ISBN 80-200-0597-8.

Prudič Zdeňk: Pěstování jeřábu břeku a oskeruše. Lesnická práce [online]
2000, 79, 7 [cit. 2017-3-3]
<http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-79-2000/lesnicka-prace-c-7-00/pestovani-jerabu-breku-a-oskeruse>

Sedlák, Petr; Mazáková, Jana; Vejl, Pavel; Sedláková, Vladimíra;
Ryšánek, Pavel: Metodika stanovení virulence izolátů *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary k významným major genům rezistence v návaznosti na jejich následné využití ve šlechtění bramboru - CERTIFIKOVANÁ METODIKA, [online], 2016, [cit. 2016-12-1]

Schmeling, Wedig Kausch-Blecken von: Der Speierling - *Sorbus domestica* L., [online], 2000, [cit. 2017-2-13]
http://www.foerderkreis-speierling.de/download/Speierling_Buch.pdf

Úradníček, Luboš; Maděra, Petr; Tichá, Soňa; Koblížek, Jaroslav: Dřeviny České republiky, 2. přeprac. vyd., Lesnická práce s.r.o, 2009, 336 s.,
ISBN 978-80-87154-62-5

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., [online], 2016,
Strnady

http://www.vulhm.cz/sites/File/Informatika/TZ_Silva_Regina_r.pdf

Žlebčík, Jiří: Jak pěstovat, sklízet a zpracovat starodávné oskeruše, [online],
2012, [cit.2016-7-6]

<http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/jak-pestovat-sklizet-a-zpracovavat-starodavne-oskeruse/>