

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta lesnická a dřevařská



**Vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné
a 1-naftyloctové na tvorbu adventivních prýtů a kořenů
u *Morus nigra* L. v *in vitro* podmínkách**

Bakalářská práce

Autor: Pavel Švagr
Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Pavel Švagr

Lesnictví

Název práce

Vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné a 1-naftyloctové na tvorbu adventivních prýtů a kořenů u *Morus nigra* L. v in vitro podmínkách.

Název anglicky

Effect of 6-benzylaminopurine and indole-3-acetic acid and 1-naphthylacetic acid on in vitro propagation of *Morus nigra* L..

Cíle práce

Vypracování literární rešerše – množení *Morus nigra* L. pomocí in vitro metod. Vyhodnotit vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné a 1-naftyloctové na růst explantátů *Morus nigra* L. 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 *Morus nigra* L..

Založení kultury *Morus nigra* L. v prostředí in vitro a následné využití sterilní kultury pro vyhodnocení vlivu přidavku 6-benzylaminopurinu (BAP) a kyselin indol-3-máselné (IBA) a 1-naftyloctové (NAA) v médiích pro multiplikaci a zakořeňování kultur.

Při sledování vlivu auxinů a cytokininů na in vitro kultury *Morus nigra* L., by měl být zvláště hodnocen vliv látek na růst (délka, počet) nově vzniklých prýtů a kořenů a na přežívání rostlinného materiálu (mortalitu) na médiích, případně při přesazení do ex vitro podmínek.

Doporučený rozsah práce

35-45 stran

Klíčová slova

Morušovník černý, mikropropagace, auxin, cytokinin, rhizogeneze

Doporučené zdroje informací

- Bhau, B.S., Wakhlu, A.K., 2003. Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. *Biologia Plantarum* 46(3), 349-355.
- Đurkovič, J., Kaňuchová, A., Kačík, F., Solár, R., Lengyelová, A., 2012. Genotype- and age-dependent patterns of lignin and cellulose in regenerants derived from 80-year-old trees of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108(3), 359-370.
- Gogoi, G., Borua, P.K., Al-Khayri, J.M., 2017. Improved micropropagation and in vitro fruiting of *Morus indica* L. (K-2 cultivar). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15(1), 249-256.
- Ivanička, J., 1987. In vitro micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. *Scientia Horticulturae*. 32(1-2), 33-39.
- Vijayan, K., Raju, P.J., Tikader, A., Saratchandra, B., 2014. Biotechnology of mulberry (*Morus* L.) – A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26(6), 472-496.
- Yadav, V., Madan, L., Jaiswal, V.S., 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae*. 44(1-2), 61-67.

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 29. 11. 2018

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 2. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 14. 02. 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma “Vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné a 1-naftyloctové na tvorbu adventivních prýtů a kořenů u *Morus nigra* L. v *in vitro* podmínkách” vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D, a použil pouze prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědom, 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 Brandýse nad Labem dne 10.4. 2019

Pavel Švagr

Poděkování

Zde bych chtěl velice poděkovat vedoucímu mé práce Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, za průběžné hodnocení testů, sdílení svých zkušeností a profesionální přístup, který mi poskytl v dlouhodobém horizontu práce v laboratoři a samozřejmě při dlouhodobém psaní této bakalářské práce.

Také bych rád poděkoval doc. Ing. Danielu Zahradníkovi, Ph.D., za poskytnutou pomoc při zpracování a vyhodnocení statistických výstupů.

Děkuji své ženě za její podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

V této práci byl zjišťován vhodný postup pro objemovou mikropropagaci morušovníku černého (*Morus nigra* L.). Namnožení kultury a multipilkace prýtů probíhala na MS médiu s přidanými vitamíny, sacharózou a BAP v hodnotách od 0 do 6 mg.L⁻¹ po dobu 4 a 8 týdnů. Odrostlé prýty následně kořenily při poloviční koncentraci MS média za přítomnosti fytohormonů IBA nebo NAA v koncentracích od 0 do 1,6 mg.L⁻¹ po dobu 8 týdnů. Úspěšně kořenící rostlinky byly dále přeneseny do nesterilního prostředí a vysazeny do a) komerčního substrátu, b) perlitu nebo c) kombinace rašeliny, písku a perlitu v poměru 2:1:1. Tato metoda může být účinně použita pro *in vitro* kultivaci *Morus nigra* L. i v komerčním měřítku, kdy bude v krátké době možné získat velké množství kvalitních rostlin za účelem další výsadby.

Klíčová slova

in vitro; fytohormony; cytokininy; auxiny; morušovník černý; zakořeňování; mikropropagace; rhizogeneze

Abstract

A rapid viable micropropagation protocol has been developed in the present work for *Morus nigra* L. utilizing the readily available nodal explants growing on MS medium containing vitamins, sacharosa and BAP 1mg.L^{-1} . Shoots multiplication phase ran on same medium supplement with various concentrations of BAP in range from 0 to 6mg.L^{-1} for 4 plus 4 weeks. Elongated shoots were cultured for roots development in half strength of MS medium separately combined from 0 to $1,6\text{mg.L}^{-1}$ NAA or IBA concentrations in 8 weeks period. Micropropagated complete plants were later transferred to different types of loam (A. peat moss:pearlite:sand in rate 2:1:1, B. perlite only, C. Soil only. This method can be effectively used for *in vitro* culture of *Morus nigra* L. in commercial scale owing to its enhanced quality and reduce time frame of grow.

Key words

in vitro; phytohormons; cytokinins; auxins; morus nigra; rooting; micropropagation; rhizogenesis

Obsah

Úvod.....	12
1 Literární část	14
1.1 Morfologie morušovníků, morušovník černý	14
1.2 Vegetativní rozmnožování rostlin.....	16
1.3 Kultivace rostlin <i>in vitro</i> a kultivační podmínky	17
1.3.1 Kultivační média.....	18
1.3.2 Postup kultivace.....	20
2 Metodika a materiál.....	24
2.1 Materiál a sterilizace kultury	24
2.2 Kořenění.....	25
2.3 Převod <i>ex vitro</i>	25
2.4 Kultivační podmínky	26
2.5 Statistické hodnocení	26
3 Výsledky.....	27
3.1 Růst a multiplikace prýtů	27
3.2 Analýza barvy listů	32
3.3 Zakořeňování	34
3.4 Převod do <i>ex vitro</i> , aklimatizace.....	37
4 Diskuze	41
5 Závěr a shrnutí.....	43
6 Přehled literatury a zdrojů	44
7 Přílohy	I

Seznam použitých zkratek

ADS	adenine sulfát
BA – 6	benzyladenin
BAP – 6	benzylaminopuryn
BAP	benzylaminopurin
CEP	6-(3-methoxybenzylamino)purine-9-β-D-(6(3MeOBA)9CEP)
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
KIN	kinetin
MA	<i>Morus alba</i>
MI	<i>Morus indica</i>
MN	<i>Morus nigra</i>
MS – medium	Murashige and Skoog medium (1962)
MT	meta-topolin (3-hydroxybenzylaminopurin)
NAA	α-naftyloctová kyselina
RR	egulátor růstu
THPP	6-benzylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl-purin

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled přípravků používaných při sterilizaci rostlinného materiálu dle koncentrace a doby působení	21
Tabulka 2: Výsledné měření průměrné výšky, vitifikace a kalusu.....	27
Tabulka 3: Homogenní skupiny měření průměrné výšky v intervalech týdnů: 0-4, 4-8, 0-8.....	29
Tabulka 4: Homogenní skupiny průměrný počet prýtů v intervalech týdnů: 0-4, 4-8, 0-8	30
Tabulka 5: Průměrný počet a délka kořínků po 8 týdnech s IBA	34
Tabulka 6: Průměrný počet a délka kořínků po 8 týdnech s NAA	34
Tabulka 7: Homogenní skupiny délky kořenů a jejich počet na ½ MS médiu s IBA.....	36
Tabulka 8: Homogenní skupiny délky kořenů a jejich počet na ½ MS médiu s NAA.....	36
Tabulka 9: Základní tabulka převodu do ex vitro	37
Tabulka 10: Tabulka výběrového měření a vážení nadzemní a pozemní části rostlin po 8 týdnech rostoucích na různých substrátech.....	38

Seznam obrázků

Obrázek 1: Multiplikace prýtů po 8 týdnech	31
Obrázek 2: Kořenění s IBA/NAA po 8 týdnech	37
Obrázek 3: Převod kultury na perlit a komerční substrát. Srovnáním první fotografie ihned po zasazení a druhé po 8 týdnech lze vidět rychlejší růst nadzemní části rostlinek na komerčním substrátu	39
Obrázek 4: Převod kultury na perlit a komerční substrát. Vlevo kořenový systém MN na perlitu a vpravo na komerčním substrátu po 8 týdnech.....	40

Seznam grafů

Graf 1: Průměrné výšky rostlinek na různých koncentracích BAP ve sledovaných obdobích.....	28
Graf 2: Průměrné výšky rostlinek na různých koncentracích BAP po 8 týdnech.....	28
Graf 3: Průměrný počet nových prýtků na různých koncentracích BAP ve sledovaných obdobích.....	30
Graf 4: Průměrný počet prýtků na různých koncentracích BAP po 8 týdnech.....	30
Graf 5: Analýza zastoupenosti definované barvy listů po 8 týdnech, 1=světlezelená,2=zelená,3=tmavězelená,4=hnědozelená,5=světlehnědá,6=hnědá,7=tmavěhnědá	32
Graf 6: Analýza zastoupenosti barev listů po 8 týdnech.....	33
Graf 7: Analýza zastoupení světlezelené barvy listů po 8 týdnech při různých koncentracích BAP.....	33
Graf 8: Průměrná délka kořínků v cm (osa y) po 8 týdnech s IBA/NAA (osa x).....	35
Graf 9: Průměrný počet kořínků (osa y) po 8 týdnech s IBA/NAA (osa x).....	35

Úvod

Legendami opředená historie o vzniku prvního hedvábného vlákna, datovaná zhruba do 26. století př.n.l., velice úzce souvisí s objektem zkoumaným v této bakalářské práci.

Přemětem tohoto dokumentu bylo nejen teoretické dohledání, studium a citace literárních zdrojů, ale i získání popisu již použitých metod a postupů pěstování rostlin *in vitro* směřovaných k morušovníkům a zároveň i praktické uplatnění těchto postupů v laboratoři, při přípravě živných a zásobních roztoků, aseptické práce v laminárním boxu, zisk a statistické zpracování růstových dat.

Cílem této práce bylo pokusně zjistit vliv cytokininů a auxinů na růst, multiplikaci prýtů a růst kořenového systému morušovníku černého, tento stav zachytit v datech a na základě statistiky formulovat závěry, které fytohormony a v jakých koncentracích jsou vhodné pro vegetativní množení MN v *in vitro* podmínkách. Záměr této práce spočíval v ověření vlivu většího nebo menšího množství cytokininu 6-benzylaminopurinu (BAP) v agarové půdě na růst a elongaci prýtů explantátů a podobně ověřit účinek auxinů, kyseliny indol-3-máselné (IBA) a kyseliny 1-naftyloctové (NAA), na rozvoj kořenových systémů rostlin ve sterilním prostředí. Závěrem tohoto praktika se hodnotila vhodnost různých typů substrátů pro další růst rostlin *ex vitro*.

Tato práce obsahuje úvodní literární rešerši s popisem a ekologickými nároky morušovníků, principy rozmnožování rostlin a detailně se věnuje mikropropagaci, včetně skutečných postupů získaných studiem jiných prací, které se zabývají stejnou tematikou. Statistické výsledky, jejich závěry a porovnání s jinými autory hodnotí užité postupy a navrhují možnosti zlepšení, či jejich změny, pro další možné testování jiných koncentrací, vzájemných kombinací nebo odlišných fytohormonů. V úplném závěru této bakalářské práce lze nalézt hodnocení výsledků zkoumání, s ohledem ke stanoveným cílům a nástin možnosti obměny nebo změny fytohormonů za účelem zisku dalších relevantních údajů, které mohou nasměrovat budoucí hledání teoreticky vhodných modelů pro multiplikaci morušovníku černého v *in vitro* podmínkách. Morušovníky jsou ovocné stromy, kterých si lze cenit nejen pro své lahodné a zdravé ovoce, ale také pro jejich estetický vzhled v zahradách a parcích. Snad i popis morušovníků v této práci

alespoň částečně přispěje k propagaci této zajímavé dřeviny a bude přínosem pro stávající nebo budoucí majitele.

1 Literární část

1.1 Morfologie morušovníků, morušovník černý

Morušovníky jsou pomalu rostoucí opadavé ovocné stromy patřící do řádu růžotvaré (*Rosales*), čeledi morušovníkovité (*Moraceae*) a patří do stejného rodu jako fíkovníky. Dvanáct druhů morušovníků je rozšířeno v mírném a subtropickém pásmu severní polokoule od Asie přes Ameriku až po Afriku (Mikuška, 2002). Morušovníky rostou na mírně kyselé až mírně alkalické půdě, špatně snáší půdy přemokřené a nejsou tolerantní k půdám zasoleným. Mírně znečištěné městské ovzduší nemá žádný negativní vliv na jejich růst, stromy snesou mírné mrazy, ale pro dobrý růst a bohatou úrodu plodů potřebují teplá, slunná a chráněná stanoviště. Morušovníky jsou rostliny velmi variabilní, vyskytují se ve formě stromů i keřů, ty dobře snáší řez a lze je tvarovat i jako živé ploty (Havliš, 2010). Tři nejznámější stromové formy morušovníků jsou definovány přidavným jménem barevnosti plodů, tedy jako morušovník bílý, červený a černý. Morušovník bílý (*Morus alba* L.) je původem z oblasti Číny a Koreje, později zdomácněl ve střední Asii a v oblasti Středozemního moře a do střední Evropy začal pronikat až v 16. století. Morušovník červený (*Morus rubra* L.), který pochází a roste v severní Americe, je na rozdíl od svých ostatních příbuzných dvoudomý a proto je nutné pěstovat jak samčí tak samičí stromy. Svým habitusem je velmi podobný morušovníku černému, jeho až 3 cm dlouhá plodenství mají tmavě purpurovou barvu a chutnají velmi sladce (Clinovishi, 2005). Morušovník černý (*Morus nigra* L.) pochází z oblasti dnešního Íránu a Afganistánu a již od starověku se pěstoval také v různých oblastech kolem Středozemního moře. Ruku v ruce s rozkvětem oboru hedvábnictví v 18. století se i v našich zemích skokově zvýšila výsadba morušovníků z důvodů čistě ekonomických, protože jejich listy jsou potravou housenek Bource morušového (*Bombyx mori* L.) a jeho zámotky poskytují vlákna pravého hedvábí. Listy morušovníků proto byly sbírány a prodávány do umělých líhní tohoto nočního motýla, které byly budovány pro průmyslové účely textilní výroby. Stromové formy morušovníků dosahují podle Mikušky (2002) 8 až 12 metrů, podle Větvičky (2012) 10 až 14 metrů a šířka koruny dospělého stromu má mezi 8 až 10 metry. Kmen MN se začíná větvit ve výšce 1 až 1,5 metru, jeho kůra je matně šedá s hnědou borkou, která bývá hluboce zvrásněna.

Kořenový systém je bohatě rozvětven a jeho objem je stejný nebo vyšší než objem koruny stromu, ale zároveň není uložen příliš hluboko v zemi a proto je při kypření půdy v okolí přibližně 10 m od paty stromu nutná vysoká míra obezřetnosti. Kořeny MN jsou na fyzické poškození velice citlivé a surový zásah do kořenového systému mívá za následek odumření celého stromu (Mikuška, 2002). MN má listy sytě zelené, tuhé s krátkým a tlustým řapíkem, které jsou typické svou heterofolií. Sytězelená až tmavozelená čepel listu je široce vejčitá, celistvá nebo hluboce nepravidelně vykrajovaná a na rubu hustě chlupatá. Báze listů bývá srdčitě vykrojená s vroubkovaně zubatým okrajem. Před opadáním listy mění svoji barvu na žlutou (Orwa et al., 2009). Protože je MN rostlina jednodomá samosprašná, mají květy moruše velmi nenápadnou růžovou barvu, protože nemusí lákat opylovače a jeho květenstvím je jehněda (*amendum*). Strom kvete od května do konce července. Plody morušovníku jsou 2 až 4 cm protáhlá souplodí peckoviček, které se nazývají moruše a připomínají tmavé plody ostružin. Po úplném dozrání, v průběhu 6 až 8 týdnů od oplození, získají plody morušovníku tmavě fialově až černě lesklou barvu, jejich chuť je příjemně sladká s jemně pikantní ostrostí vitamínu C (Orwa et al., 2009). Také morušovníky jsou napadány hmyzem, houbami a bakteriemi. Již byl zmíněn noční motýl Bourec morušový (*Bombyx mori* L.), který se živí latexem obsaženým v listech, ty také napadá Sviluška chmelová (*Tetranychus urticae* C.L.Koch), zároveň mohou být morušovníky také mezihostitelem larev Štítenky morušové (*Pseudaulacaspis pentagon* T.Tozzett) (Biolib.cz, 2018). Tvrdé jádrové dřevo morušovníků s výraznou kresbou v Japonsku používá firma Kakusui k výrobě soudků na třtinový rum Ryoma (Kakusui, 2018) a v Turecku se používá k výrobě těl hudebních nástrojů saz nebo darbuka (Orwa et al., 2009). MN je strom s širokou škálou použití. Jeho lahodné plody jsou okamžitým zdrojem vitamínu C s protizánětlivými účinky dutiny ústní a tonizujícím účinkem na ledviny a močové cesty. Protože plody morušovníku rychle podléhají zkáze nelze je dlouhodobě skladovat v surové formě, ale je možné je po sklizni zpracovat na víno, kompoty, marmelády, šťávy, samozřejmě je možné je zamrazit nebo usušit a sušené dále zpracovat na sladkou mouku pro přípravu pokrmů. Nejen plody jsou lidskému zdraví prospěšné. Nasušené a později svažené listy jsou silným pomocníkem při nachlazení, kořeny macerované v alkoholu pomáhají proti astmatu a hypertenzi

(Spohn a Spohn, 2008) (Cibulka, 2003) (Dolejš et al., 1991). V České republice je v online databázi chráněných stromů AOPK ČR dohledatelných pouze 7 morušovníků bez udání jména druhu, tedy binomického jména. Památné stromy jsou v terénu označeny tabulemi s malým státním znakem České republiky a tabulemi s textem „památný strom“ nebo „památné stromy“. Výšky těchto morušovníků se pohybují od 7 do 11 metrů a obvody kmenů od 158 do 428 cm. Nejstarší v databázi evidovaný morušovník roste v obci Olšovec v Pardubickém kraji od roku 1829. Na mapových podkladech soukromého webového projektu Morušová zahrada, který od roku 2014 postupně mapuje výskyt morušovníků mimo soukromé pozemky na celém území ČR, lze aktuálně nalézt 190 dospělých stromů s detaily jejich pozice (Lánský, 2014).

1.2 Vegetativní rozmnožování rostlin

Rozmnožování rostlin se dělí na pohlavní a nepohlavní. Při pohlavním rozmnožování se vyvíjí nový jedinec z embrya, naopak při nepohlavním rozmnožování nevzniká nový jedinec splynutím samčích a samičích gamet, ale vzniká z vegetativních částí mateřské rostliny. Vegetativním rozmnožováním rostlin vznikají klony, tedy skupiny geneticky shodných jedinců vzniklých rozmnožením z jediného organismu. U mnoha rostlinných druhů je vegetativní rozmnožování jedinou nebo převažující formou, protože představuje nejrychlejší cestu daného taxonu obsadit určité stanoviště (Salaja a Behova, 2006). Vegetativní rozmnožování krytosemenných rostlin vychází z jejich velké regenerační schopnosti zvané totipotence. U některých druhů, zavlečených mimo oblast původního rozšíření, může být tento způsob rozmnožování jediný možný, protože abiotické podmínky nových stanovišť nejsou vhodné pro klíčivost semen nebo je důvodem absence jedinců druhého pohlaví na novém stanovišti (Kincl et al., 2008). Cílem vegetativního rozmnožování je udržet kladné vlastnosti vyšlechtěných rostlin, je základem pěstování také kulturních plodin a má široké uplatnění. V zahradnické praxi se používají řízky stonkové (rybíz), kořenové (křen, ostružiník) a listové (begonie). Řízkováním se množí i některé lesnické významnější stromové dřeviny, zejména topoly, vrby, javory, řízky se obvykle odebírají na podzim a v zimě, kdy mají dostatek zásobních látek a zakořenit se nechávají na jaře. Některé ovocné dřeviny (líska, rybíz) lze snadno vegetativně množit hřížením (Bischof a Sus, 1998) a tento postup popisuje

u MN v okolí Pukance na Slovensku také Mikuška (2002). Při této technice se odstraní část kůry na sklánějící se větvi, kde se předpokládá budoucí vývoj kořenů, přichytí se do mělké vyhloubené jamky a překryje zeminou. Podle vývoje kořenů se větev po dvou až třech letech oddělí od mateřského stromu řezem. MN se rozmnožuje generativně i vegetativně, ovšem v podmínkách mírného pásma je generativní rozmnožování podle Mikušky problematické vzhledem k nízké klíčivosti semen, citlivosti semenáčků vůči abiotickým podmínkám (chlad, mrazy, nestálý vodní režim), pomalému růstu a malé snášenlivosti vůči přesazování (Mikuška, 2002). Koyuncu (2004) uvádí testovanou klíčivost semen MN při teplotě 25⁰C 33% a po studené stratifikaci v trvání 100 dní se hodnota klíčivosti zvýšila na 88%. Generativní rozmnožování morušovníků ve volné přírodě, kde jsou vhodné podmínky pro klíčení, zajišťují především ptáci. Těm projdou moruše trávícím traktem, v něm semena částečně stratifikují a trusem se dostanou i mnoho kilometrů od mateřské rostliny (Koyuncu, 2004).

1.3 Kultivace rostlin *in vitro* a kultivační podmínky

Při vegetativním rozmnožování rostlin *in vitro* se zakládají explantátové kultury rostlin a probíhá aseptická kultivace izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Pro založení explantátové kultury je třeba izolovat buňky, pletiva nebo orgány a kultivovat je ve sterilních podmínkách řízeného prostředí, které mimo jiné zahrnují definovaná kultivační média, teplotu, vlhkost, kvalitu a kvantitu světla. Všechny tyto faktory významně ovlivňují průběh kultivace, ale parametrů vstupujících do tohoto procesu je více (Kováč, 1995). Protože část přírodních podmínek explantátu nahrazuje kultivační médium, kde postupem času dochází k postupnému poklesu obsahu živin, které posléze může omezovat růst explantátů, je nutné explantáty pravidelně pasážovat na čerstvé médium (Kováč, 1995). Kromě kultivačního média jsou dalšími vlivnými činiteli pěstování intenzita a kvalita osvětlení, fotoperioda, teplota místnosti nebo plynná fáze uzavřeného kultivačního prostředí (Procházka a Šebánek, 1997).

In vitro kultura je polouzavřený systém, který v aseptickém režimu poskytuje kyslík, vodu, organické zdroje uhlíku, živiny a regulátory rostlinného růstu při regulované teplotě kultivačních místností.

Výhodou kultivace je, že jakákoli část donorové rostliny může být dopěstována v novou rostlinu a nejčastěji se ke kultivaci používají vegetativní vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů nebo kořene, embrya, semena, spory i jednotlivé buňky. (Bischof a Sus, 1998). Dalším pozitivem při pěstování explantátů *in vitro* jsou malý rozměr explantátu, vysoký množitelský koeficient, zkrácení množitelského cyklu a také možnost kontinuální práce i v období vegetačního klidu (Prknová, 2008). Parametry ovlivňující růst a vývoj explantátu dělíme na endogenní a exogenní. Endogenní faktory, které můžeme do určité míry ovlivnit, zahrnují kvalitu donorové rostliny, tedy její fyziologický případně genetický stav a udržení sterility kultivace. K exogenním faktorům, které jsme schopni zcela kontrolovat, patří složení živného média a fyzikální faktory kultivace zahrnující teplotu a osvětlení (Róth, 2011). Vlastnosti světla, které nejvíce ovlivňují růst a vývoj explantátů jsou fotoperioda a intenzita osvětlení. Fotoperioda, tedy časový průběh střídání světla a tmy, má vliv na morfogenezi explantátů. Většina rostlin potřebuje pro stimulaci růstové fáze vývoje 12 až 16 hodin světla denně, tato perioda se však liší v závislosti na rostlinném druhu (Bischof a Sus, 1998). Světelná intenzita neboli množství fotonů obsažených ve světelném záření, které dopadne na explantát za určitý čas, se rovná množství dodané světelné energie, která ovlivňuje vydatnost fotosyntézy, na které závisí růst a vývoj rostlin. Světelná intenzita také ovlivňuje vývoj a stavbu listu a množství chlorofylu obsaženého v listech. V kultivačních místnostech je světelná intenzita poskytnutá zářivkami poměrně nízká a explantáty proto listy obsahují menší koncentraci chlorofylu.. Kvůli tomuto omezení nejsou explantáty schopny plné autotrofie a nedostatek glukózy, která vzniká při fotosyntéze, musí být dorovnáván přísunem energie v podobě cukrů obsažených v kultivačních médiích (Kováč, 1995).

1.3.1 Kultivační média

Základem pro růst a vývoj explantátových kultur je uměle vytvořené kultivační médium. To je pro explantáty zdrojem minerálních látek, tedy mikro a makroprvků, organických látek, především cukrů jako zdroje energie a uhlíku, dále vitamínů a přidávaných fytohormonů (růstových regulátorů). Minerální látky, nezbytné pro růst rostlin, jsou v médiu obsaženy ve formě solí. Ty obsahují prvky makrobiogenní (N, P, K, Ca, Mg, S)

a mikrobiogenní (Mn, Zn, B, Cu, Fe) (Sladký a Šebánek, 1988). Sacharidy jsou používány v kultivačních médiích jako zdroj energie a vitamíny reprezentuje v agarové půdě thiamin, pyridoxin a kyselina nikotinová. Všechny mikroprvky, makroprvky, vitamíny a růstové regulátory se většinou nepřidávají do připravovaného média přímou navážkou, ale pomocí zásobních roztoků (Kováč, 1995). Různá média mají rozdílná složení prezentovaná především množstvím makro a mikroprvků. Kromě často používaného média MS (Murashige a Skoog, 1962) lze použít jiné, příkladně SH médium (Schenk a Hildebrandt, 1972), QL médium (Quoirin a Lepoivre, 1977), WPM (LLoyd a McCown, 1980) nebo BTM (Chalupa, 1989) (Hradilík, 2005). Optimální pH agarové půdy je mírně kyselé v rozmezí 5,5 až 5,8 a může být regulováno přidáním zásady či kyseliny při přípravě roztoku, dle průběžného měření pomocí pH metru (Sladký a Šebánek, 1988). Živná média lze připravit jako pevná i tekutá. Tekutá živná média se obvykle používají pro kultivaci mikroorganismů na Petriho miskách, pro explantáty rostlin a jejich růst se média ztužují obvykle přidáním agaru v množství 6 až 8 mg.L⁻¹, ale může se lišit dle potřeby konkrétní kultury, typu nebo výrobce agaru. Agar se musí dokonale rozpustit a proto se médium přivede k bodu varu v mikrovlnné troubě. Živná média se buď nalévají do větších nádob, které se uzavřou a autoklavují, nebo se médium nalévá přímo do baněk a sklenic, nejlépe do zavařovacích nádobek s přiléhavým šroubovacím uzávěrem. Agarová živná půda se přímo v těchto nádobách sterilizuje v autoklavu a provádí se po dobu 15-20 minut při 121°C (Chalupa, 1989) a po následném ochlazení dojde k finálnímu ztužení média. Pro pasážování se následně nádobky otevírají až v laminárním flow boxu z důvodů udržení maximálně sterilního prostředí pěstovaných rostlin (Sladký a Šebánek, 1988). Mezi růstové regulátory používané při kultivaci *in vitro* patří auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová. Jednotlivé druhy dřevin a jejich explantáty mají při kultivaci *in vitro* specifické nároky na přítomnost a koncentraci růstových regulátorů. Auxiny jsou nejdéle známými rostlinnými hormony (Procházka a Šebánek, 1997) a prvním známým auxinem byla kyselina indol-3-octová (IAA), jako růstový stimulátor ji identifikoval holandský chemik Kögel v roce 1934, později byly v rostliných pletivech zjištěny další látky auxinového typu, především kyselina indol-3-máselná (IBA) a kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA). V laboratorní praxi se dnes častěji využívají auxiny syntetické,

protože jsou chemicky stálejší a jsou to zejména kyselina α -naftyloctová (NAA) a kyselina 2, 4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Luštinec a Žárský, 2005). Přítomnost auxinů je nutná v kultivačním médiu pro indukci kalusu. Různé kombinace auxinů a cytokininů se využívají pro vyvolání organogeneze v orgánových i kalusových kulturách. Dále se používají při indukci somatické embryogeneze a zakořeňování *in vitro*. Při zakořeňování regenerátů se používají nízké koncentrace IBA nebo NAA (Procházka a Šebánek, 1997), jejich činnost se při nízké koncentraci pod 10 mg.L^{-1} zvyšuje, v koncentraci nad 10 mg.L^{-1} již působí jako inhibitory, protože dochází k vyššímu uvolňování etylenu (Hradilík, 2005). Cytokinininy jsou růstové regulátory a mezi jejich účinky patří stimulace buněčného dělení, potlačení apikální dominance a stimulace růstu adventivních pupenů. Velmi často se v kultivaci *in vitro* používají 6 – benzylaminopuryn (BAP), kinetin a zeatin, ale jejich účinnost snižuje příliš vysoká teplota a jejich termální optimum je kolem 21°C (Sedlák a Paprstein, 2015). Složení kultivačního média MS je v sekci “Přílohy” tohoto dokumentu.

1.3.2 Postup kultivace

1.3.2.1 Zakládání aseptické kultury

Této fázi předchází selekce a příprava mateřské rostliny pro odběr materiálu, který bude po dalších přípravách základem pěstované kultury. Úspěch odvození sterilní kultury a růst životaschopných explantátů je ovlivňován nejen ročním obdobím odběru, ale také změnami teplot, délkou dne, hladinou osvětlení a dostupností vody. Všechny tyto faktory stojí za změnami obsahu sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlině a tím významně ovlivňují komfortní zónu růstu odebraného materiálu (Róth, 2011), proto je doporučeno materiál získat v období vegetačního klidu donorové rostliny. Gogoi et al. (2016) odebrané vrcholové pupeny nejprve pod tekoucí vodou očistili jemným kartáčkem, následovala dvouminutová lázeň v 2% roztoku Tween-20 a pětiminutové odstředování při frekvenci 100 Hz. Po trojitém propláchnutí destilovanou vodou byly použity 3 metody sterilizace povrchu, první byla kombinace ponořením materiálu do 2% NaOCl po dobu 5 minut, poté do 0,1% HgCl_2 po dobu 3 minut a následovalo ponoření do 70% etanolu po dobu 1 minuty. Následně proběhla

další minutová lázeň v destilované vodě a odstranění krycích šupin pupenů ve sterilizovaném prostředí flowboxu. Attia et al. (2014) postupovali při sterilizaci povrchu odebraných pupenů podobným způsobem jako Gogoi et al. (2016) ovšem jen kombinací ponoření materiálu do etanolu a po propláchnutí destilovanou vodou do roztoku 0,5% NaClO. Také Pattnaik et al. (1996) použili podobnou metodu přípravy materiálu jako Gogoi et al. (2016), ke sterilizaci povrchu však použili pouze ponoření pupenů do 0,1% roztoku HgCl₂ po dobu 10 minut a šestinásobné oplachování destilovanou vodou.

Tabulka 1: Přehled přípravků používaných při sterilizaci rostlinného materiálu dle koncentrace a doby působení

účinná látka	chemický vzorec	koncentrace (%)	doba působení (min)
chlorid rtuťnatý	HgCl ₂	0,1-1	2-25
chlornan sodný	NaClO	0,5-5	3-30
chlorid vápenatý	CaCl ₂	4-5	5-30
dusičnan stříbrný	AgNO ₃	1	5-30
peroxid vodíku	H ₂ O ₂	3-12	5-15
etanol	C ₂ H ₅ OH	70	5
bromová voda	Br ₂	1-2	2-10

Zdroj: (Hradilík 2005)

1.3.2.2 Proliferace explantátové kultury

V tomto stadiu je hlavním úkolem namnožení explantátu. Za opakovaného pasážování na čerstvé médium se zvyšuje počet explantátů v kultuře rostlinného materiálu. Proces je ukončen tehdy, kdy bylo dosaženo žádaného počtu prýtlů, buněk, embryí nebo kořínků. Diferenciace buněk může probíhat formou stimulace tvorby prýtlů, tvorby adventivních prýtlů nebo somatickou embryogenezí (Kováč, 1995). Po zisku dostatečného množství prýtlů začínají programové zkoušky předem definovaných fytohormonů a jejich koncentrací na růst a multiplikaci prýtlů.

Gogoi et al. (2016) i Attia et al. (2014) v této fázi použili MS médium doplněné o 2 mg.L⁻¹ glycinu, 100 mg.L⁻¹ myo-inositolu, 0,5 mg.L⁻¹ niconitic acidu, 0,5 mg.L⁻¹ pyridoxinu, 0,1 mg.L⁻¹ thiaminu, 30 g.L⁻¹ sacharózy a 8 g.L⁻¹ agaru a kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 25-26⁰C bez přidaného fytohormonu BAP, Pattnaik et

al. (1996) postupovali stejným způsobem, ale množství dodané sacharózy do agarové půdy bylo 20 mg.L⁻¹. Proliferace explantátů podle Pattnaik et al. (1996) probíhala na MS médiu s přidanými fytohormony v různé koncentraci a vzájemné kombinaci, BAP 0,25 až 5 mg.L⁻¹, Kn 0,25 až 5 mg.L⁻¹ a GA₃ 0,2 až 0,3 mg.L⁻¹, při teplotě kultivační místnosti 25⁰C. Anis et al. (2003) použili pro kombinaci multiplikaci prýtlů *Morus alba* MS médium s přidáním BAP a NAA s koncentraci 0,5 až 3 mg.L⁻¹, Mehbooba et al. (2011) pak BAP v kombinaci s Kn pro růst, pro multiplikaci prýtlů pak na MS médiu pouze BAP v koncentraci 0 až 5,5 mg.L⁻¹.

1.3.2.3 Zakořeňování in vitro

V průběhu tohoto stadia prýty zakořeňují. Na začátku fáze zakořeňování je potřeba explantáty přepasážovat na kultivační médium, které neobsahuje cytokininy, protože ty mohou růst kořenů inhibovat v závislosti na větší míře tvorby kalusu, ze kterého se kořínky odlamují. Další faktory ovlivňující úspěšné zakořeňování explantátu jsou světlo, teplota, makroelementy, mikroelementy a organické komponenty obsažené v médiu. Tvorbu kořenů můžeme stimulovat přepasážováním na médium obsahující auxiny. U některých druhů je nutné auxiny aplikovat po celý průběh zakořeňování, na některé druhy však po indukci tvorby kořenů může další přítomnost auxinu při zakořeňování působit negativně a inhibovat růst kořenů., zakořeňování je také závislé na druhu použitého média (Kováč, 1995). Pokud je explantát kultivován na pevném médiu, obsažený agar může způsobit špatnou aeraci média a tím nežádoucí redukci kořenových vlásků (Hradilík, 2005). Medková (2013) použila při zakořeňování MN přidané různé druhy fytohormonů o jediné koncentraci v hodnotě 1 mg.L⁻¹ THHP, CEP, MT, BAP na WPN médiu, kde testovala jen rozdíly mezi cytokininy. Zakořeňování *morus australis* v práci Pattnaik et al. (1996) probíhalo na MS médiu s přidáním IAA, IBA, IPA, NAA v koncentracích od 0,25 až 2,0 .L⁻¹ a dodanou sacharózou 20 g.L⁻¹. Anis et al. (2003) pro zakořeňování *morus alba* použili MS médium s přidáním auxinů IBA a NAA v koncentraci 0,5 až 2,0 mg.L⁻¹. Mehbooba et al. (2011), použili pro zakořeňování MN opět médium MS s přidáním IAA 0,5 a 1 mg.L⁻¹, IBA 2 a 3 mg.L⁻¹ nebo 0,5 až 1,7 mg.L⁻¹.

1.3.2.4 Přenos do ex vitro a aklimatizace

Toto stadium jako jediné probíhá v nesterilních podmínkách. Explantáty se odebírají z kultivačních médií a nechávají se zakořeňovat v umělých substrátech. Tyto substráty by měly být slabě kyselé až neutrální, mít vysokou vodní kapacitu a měly by zajišťovat dostatečnou aeraci kořenů. Před přesazením do substrátu je důležité kořeny důkladně opláchnout od zbytků živného média, aby se minimalizovalo nebezpečí kontaminace. Odtud nastává fáze aklimatizace rostliny na změněné podmínky prostředí, životního prostoru, sníženou vzdušnou vlhkost a přechod na autotrofní způsob výživy. Pro rostlinný organismus to znamená, že už dále nebude čerpat uhlík ze sacharózy obsažené v živném kultivačním médiu, ale musí jej získat procesem fotosyntézy ze vzdušného oxidu uhličitého. Tento náročný přechod z heterotrofie na autotrofii trvá delší dobu kvůli fotosyntetické nefunkčnosti původních listů. (Kováč, 1995). Rostlina je využívá spíše jako zásobní orgány poskytující organické látky pro růst nových listů, které už budou schopny samostatně fotosyntetizovat a regulovat osmózu buněk (Róth, 2011).

Mehbooba et al. (2011) před přenosem rostlinky MN oplachovali pod tekoucí vodou za účelem promytí kořínků od zbytků agarové půdy, následovalo 10 minutové máčení v 0,05% fungicidu Baveston. Rostlinky přenášeli do plastových květináčků naplněných vermikulitem nebo směsí rašeliny a písku v poměru 1:1. Pak byly denně zalévány vodou a MS médiem v poměru 1:1. Pattnaik et al. (1996) rostliny *morus australis* pouze opláchli pod tekoucí vodou, přenesli do autoklávovaného substrátu v květináčcích o průměru 5 cm v uzavřeném boxu s 80% vlhkostí a udržované teplotě $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ a průběžně zalévali destilovanou vodou a MS médiem v poměru 8:1. Anis et al. (2003) postupovali stejným způsobem a dokládají mortalitu 10% v průběhu 2 týdnů.

2 Metodika a materiál

2.1 Materiál a sterilizace kultury

Materiál pro tuto práci byl odebrán v roce 2014 z MN rostoucí v brněnské botanické zahradě a hlavním cílem bylo získat sterilní kulturu, proto bylo provedeno povrchové ošetření získaného materiálu k redukci počtu mikroorganismů a pevných částic na jejím povrchu omytím v roztoku destilované vody a smáčedla Tween 20, 2-3 kapkami v 200 ml H₂O, poté následovalo promytí vodou pro smytí smáčedla a drobných částic. Pak byl materiál ponořen po dobu 10 minut do 0,05 % sterilizačního roztoku chloridu rtuťnatého (HgCl₂) a několikrát propláchnut destilovanou vodou ve sterilním prostředí flowboxu. Následovaly cyklické přípravy základního MS média doplněného vitamíny 2 mg.L⁻¹ glycinu, 100 mg.L⁻¹ myo-inositolu, 0,5 mg.L⁻¹ nicotinic acidu, 0,5 mg.L⁻¹ pyridoxinu, 0,1 mg.L⁻¹ thiaminu, 30 g.L⁻¹ sacharózy a BAP v koncentraci 1 mg.L⁻¹, které sloužilo pro masivní namnožení explantátů potřebných pro plánované testy. Pro fixaci pH média na hodnotě 5,7 až 5,8 bylo použito KOH nebo krystalky kyseliny citronové. Pro utužení média bylo do hotové směsi přidáno 6 g.L⁻¹ agaru (Krulich s.r.o). Dále byla směs přivedena k varu v mikrovlnné troubě, aby se agar dokonale rozpustil, a následovalo postupné rozlévání média po cca 30 ml do sklenic od dětské výživy o objemu 200 ml. Sklenice byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu Sanyo při 121⁰C a tlaku 110 kPa po dobu 15 minut. Repasážování explantátů na čerstvé médium probíhalo po uplynutí přibližně doby jednoho měsíce z důvodu vyčerpání zásobních látek rostlinkami v agarové půdě. Tímto postupem byl získán dostatečný počet rostlin pro následný soubor testů. Testy multiplikace prýtů probíhaly opět na MS médiu s přidáním předem definovaných koncentrací BAP v rozsahu 0 až 6 mg.L⁻¹. Pro multiplikaci prýtů v délce trvání 4 a 8 týdnů bylo připraveno 20 explantátů v každé koncentraci BAP pro primární test a stejně velký byl i kontrolní vzorek. Po 4 týdnech byly zaznamenány hodnoty délky, počtu nových prýtů, barvy listů, množství kalusu, vitrifikace, mortalita a rostlinky byly přesazeny na čerstvé médium o stejné koncentraci MS s BAP a po dalších 4 týdnech byly opět zapsány sledované hodnoty do tabulek.

Celková délka testu multiplikace tedy činila 8 týdnů pro 40 rostlin v každé koncentraci BAP. Tento test probíhal v definovaných kultivačních podmínkách (kapitola 2.4)

2.2 Kořenění

Testy kořenění probíhaly s přidáním předem definovaných koncentrací IBA a NAA v rozsahu 0-1,6 mg.L⁻¹ na poloviční koncentraci MS média včetně přidávaných vitamínů a sacharózy, ale již bez účasti fytohormonu BAP. Poloviční koncentrace MS média byla použita pro stresování explantátů a k nucené tvorbě kořínků. IBA a NAA se v definovaných koncentracích testovala v délce trvání 8 týdnů pro minimálně 20 rostlinek primárního a 20 rostlinek kontrolního vzorku. Tento test probíhal po dobu 8 týdnů bez přesazování na čerstvé médium v definovaných kultivačních podmínkách (kapitola 2.4).

2.3 Převod *ex vitro*

Explantáty s vyvinutými kořeny byly poté převedeny do podmínek *ex vitro*, do plastových květináčků s nesterilním substrátem. Část materiálu se vysazovala do čistého perlitu, další do komerčního substrátu (Gramoflor GmbH&Co.Kg, Německo) ve kterém byly přidány spory mykorhizních hub (+MO) a část do vlastního namixovaného substrátu, který se skládal z rašeliny, písku a perlitu v poměru 2:1:1. Perlit je lehká, zrnitá, pórovitá hmota bílé nebo šedobílé barvy, vyráběna tepelným zpracováním amorfního křemičitanu hlinitého $A_{12}Si_2O_5(OH)_4$ sopečného původu, který patří ke kyselým vulkanickým sklům obdobně jako obsidián, smolek a pemza, od kterých se liší obsahem chemicky vázané vody. Tepelným zpracováním (expandací) při teplotách 900-1300°C vznikne produkt ve formě drobných dutých kuliček různých velikostí. Prvotní aklimatizace na vnější podmínky probíhala v plastových miniskleníkách v definovaných kultivačních podmínkách (kapitola 2.4).

2.4 Kultivační podmínky

Všechny testy růstu *in vitro* kultur a kořenění *ex vitro* probíhaly v kultivační místnosti s řízenou teplotou $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ a fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Světelným zdrojem byly zářivky typu studené denní světlo firmy Philips, typ Master TL-D Super s kódem barvy 865-6500 Kelvinů, příkonem 36W, světelným tokem 3250 lumenů a hustotě proudu fotonů $35\text{-}40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.5 Statistické hodnocení

Statistická data nasbíraná v průběhu testů byla pro účely jednoduchých tabulek a grafů do textu zpracována v Excelu, pro přehledné zobrazení průměrů výšek rostlin, délek/počtu kořenů a počtu nových prýtů vzhledem k sledovaným časovým úsekům. Pokročilé analýzy dat, tedy porovnávání statistických výsledků mezi koncentracemi BAP, IBA, NAA, jejich časové osy, barevnosti listů listů byly zpracovány pomocí tabulek analýzy rozptylu a modulu homogenních skupin v programu R. Program R je matematický software specializovaný na statistiku, jeho předností je především testování hypotéz, výpočet analýzy rozptylu, Weibullovo a Studentovo rozdělení, vykreslování 2 a 3-D grafů. Výstupy z tohoto programu byl v našem případě krabicový graf, číselná analýza rozptylu a tabulka homogenních skupin. Analýza rozptylu porovnávala testovací a kontrolní vzorky na hladině významnosti 0,05 dle Studentova rozdělení. Tabulka homogenních skupin sleduje nevýznamné nebo naopak významné odchylky naměřených hodnot jednotlivých koncentrací a skládá je jako členy do skupin velmi podobných vlastností. Další tabulky a grafy byly na základě sběru dat zpracovány v Microsoft Excel, který je součástí Microsoft Office Standard 2010. V protokolech růstu a multiplikace prýtů byly zaznamenávány hodnoty následujících parametrů: počet týdnů, číslo kontrolní skupiny, koncentrace BAP, výška explantátu, počet nových prýtků, vitifikace, velikost vzniklého kalusu, barva listu/listů explantátu, délka a počet kořínků. V protokolech kořenění byly zaznamenány hodnoty následujících parametrů: počet týdnů, číslo kontrolní skupiny, koncentrace IBA/NAA, délka a počet kořínků.

3 Výsledky

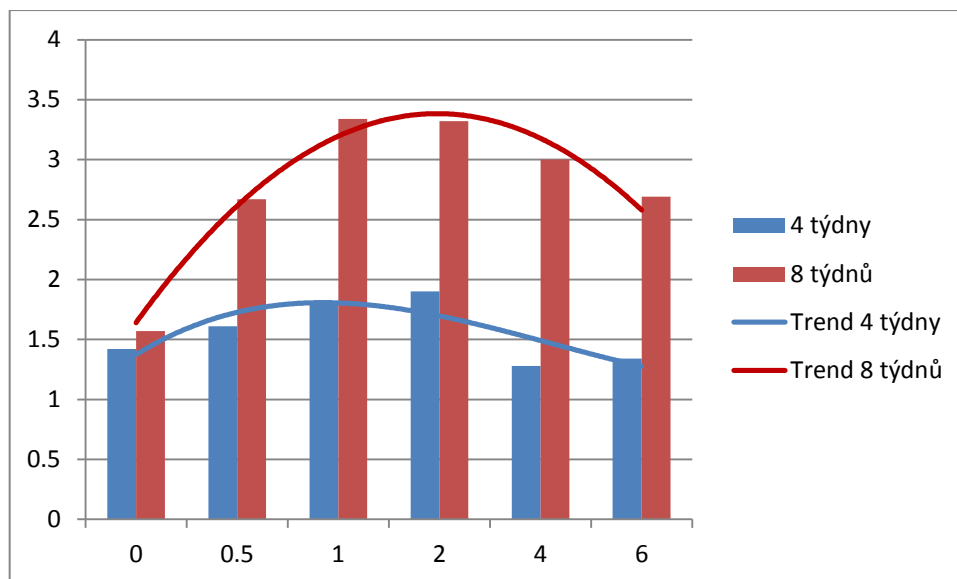
3.1 Růst a multiplikace prýtů

Analýzou rozptylu mezi testovacím a kontrolním vzorkem explantátů při růstu a multiplikací prýtů nebyly zjištěny žádné významné rozdíly na hladině významnosti 0,05 (Studentův test) a lze tvrdit, že oba vzorky vykazují stejné či zanedbatelně rozdílné hodnoty zjištěných parametrů.

Tabulka 2: Výsledné měření průměrné výšky, vitrifikace a kalusu

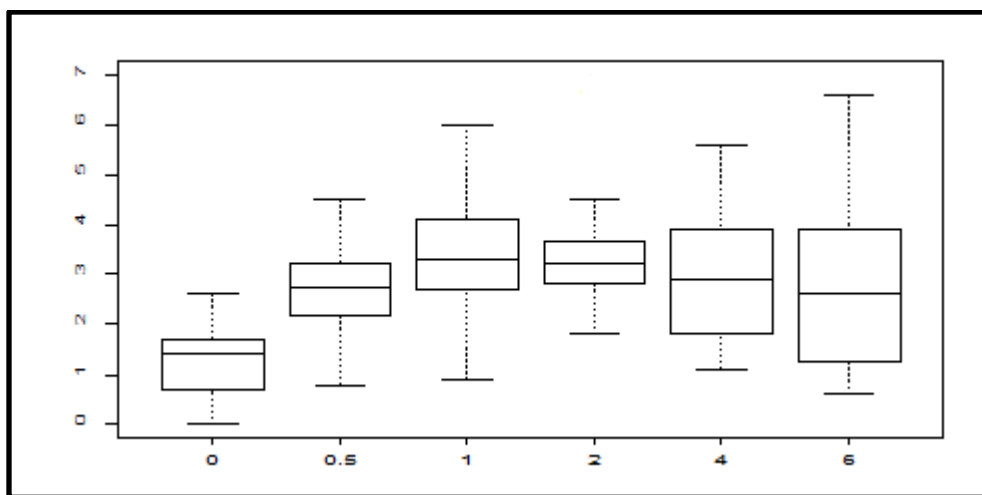
BAP mg.L ⁻¹	Ø výšky, 4 týdny	Ø počet nových prýtů, 4 týdny	Ø výšky, 8 týdnů	Ø počet nových prýtů, 8 týdnů	% vitrifika ce, 8 týdnů	% kalus, 8 týdnů
0,0	1,42d ± 0,24	1,60f ± 0,18	1,57f ± 0,3	2,24f ± 0,21	4,4	6,6
0,5	1,61c ± 0,49	2,69d ± 0,26	2,67e ± 0,62	6,11b ± 0,28	2,7	0
1,0	1,82b ± 0,65	3,28a ± 0,26	3,34a ± 0,93	5,08e ± 0,37	15,5	13,7
2,0	1,90a ± 0,47	3,23b ± 0,29	3,32b ± 0,67	5,10d ± 0,24	8,3	13,1
4,0	1,28f ± 0,81	2,65e ± 0,18	3,00c ± 1,04	6,28a ± 0,27	25	15
6,0	1,34e ± 0,89	2,95c ± 0,19	2,69d ± 1,43	5,95c ± 0,21	38,1	50

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 1: Průměrné výšky rostlinek na různých koncentracích BAP ve sledovaných obdobích

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 2: Průměrné výšky rostlinek na různých koncentracích BAP po 8 týdnech

Zdroj: statistický program R

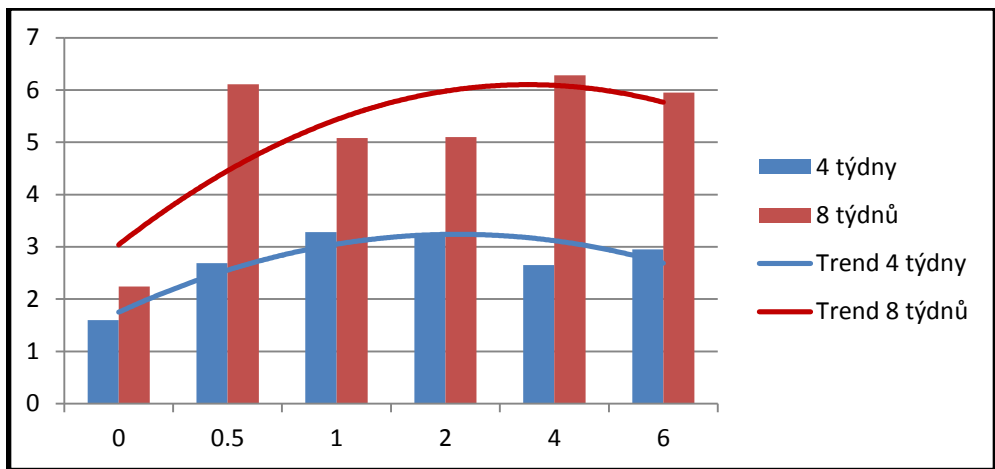
Tabulka 3: Homogenní skupiny měření průměrné výšky v intervalech týdnů: 0-4, 4-8, 0-8

4	1.29		0	-0.23		0	1.6	
6	1.34		0.5	1.04		4	2.62	
0	1.42		6	1.28		0.5	2.69	
0.5	1.61		2	1.41		6	2.95	
1	1.82		1	1.52		2	3.23	
2	1.9		4	1.69		1	3.29	

Zdroj: statistický program R

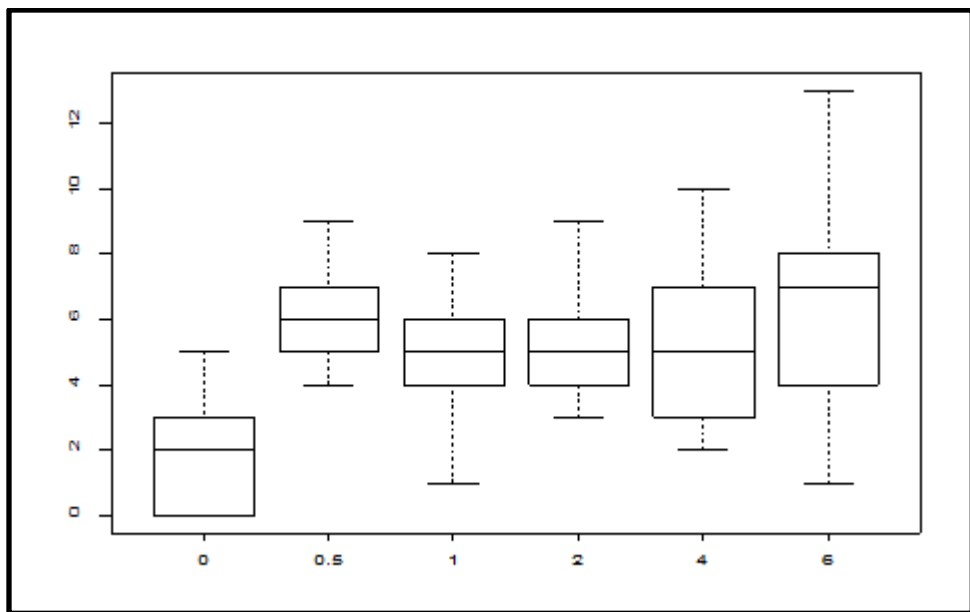
V tabulce homogenních skupin byl růst rostlin v intervalu mezi nultým a čtvrtým týdnem pozitivně hodnocen ve skupině BAP 0,5/1/2 mg.L⁻¹, v intervalu mezi čtvrtým a osmým týdnem byl pozitivně hodnocen ve skupině BAP 1/2/4/6 mg.L⁻¹ a mezi nultým a osmým týdnem, tedy v délce trvání celého testu, byl pozitivně hodnocen ve skupině BAP 0,5/1/2/4/6 mg.L⁻¹. Lze tvrdit, že mezi členy poslední zmíněné skupiny nelze určit významné statistické rozdíly, všechny však vykazují kvalitativně lepší podmínky pro růst rostlin než BAP 0 mg.L⁻¹.

Závěrem statistických výsledků lze pro opakování růstu rostlin v *in vitro* podmínkách doporučit použití MS média s přidáním BAP v koncentraci 2 mg.L⁻¹ vzhledem k nízké vitrifikaci a tvorby kalusu než u BAP 1 mg.L⁻¹.



Graf 3: Průměrný počet nových prýtků na různých koncentracích BAP ve sledovaných obdobích

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 4: Průměrný počet prýtků na různých koncentracích BAP po 8 týdnech

Zdroj: statistický program R

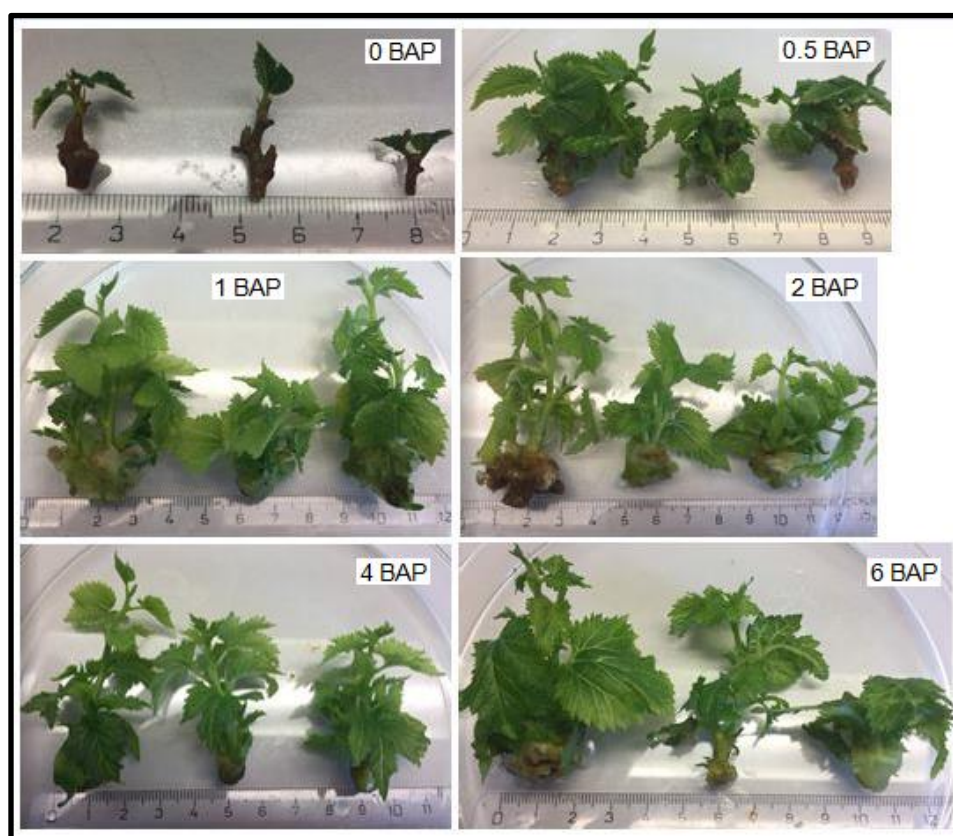
Tabulka 4: Homogenní skupiny průměrný počet prýtků v intervalech týdnů: 0-4, 4-8, 0-8

0	1.6		0	0.09		0	1.69	
4	2.62		1	1.8		4	5.05	
0.5	2.69		2	1.88		1	5.09	
6	2.95		4	2.42		2	5.1	
2	3.23		6	2.87		6	5.95	
1	3.29		0.5	3.26		0.5	6.12	

Zdroj: statistický program R

V tabulce homogenních skupin byla multiplikace prýtů v intervalu mezi nultým a čtvrtým týdnem pozitivně hodnocena skupina BAP 0,5/1/2/6 mg.L⁻¹, v intervalu mezi čtvrtým a osmým týdnem byla pozitivně hodnocena skupina BAP 0,5/4/6 mg.L⁻¹, která vykazovala lepší parametry než skupina BAP 1 a 2 mg.L⁻¹, v hodnocení multiplikace mezi nultým a osmým týdnem byla pozitivně hodnocena skupina opět celá skupina BAP 0,5/1/2/4/6 mg.L⁻¹. Lze tedy tvrdit, že mezi členy poslední zmíněné skupiny nelze určit významné statistické rozdíly, všechny však vykazují kvalitativně lepší podmínky pro multiplikaci, než BAP 0 mg.L⁻¹.

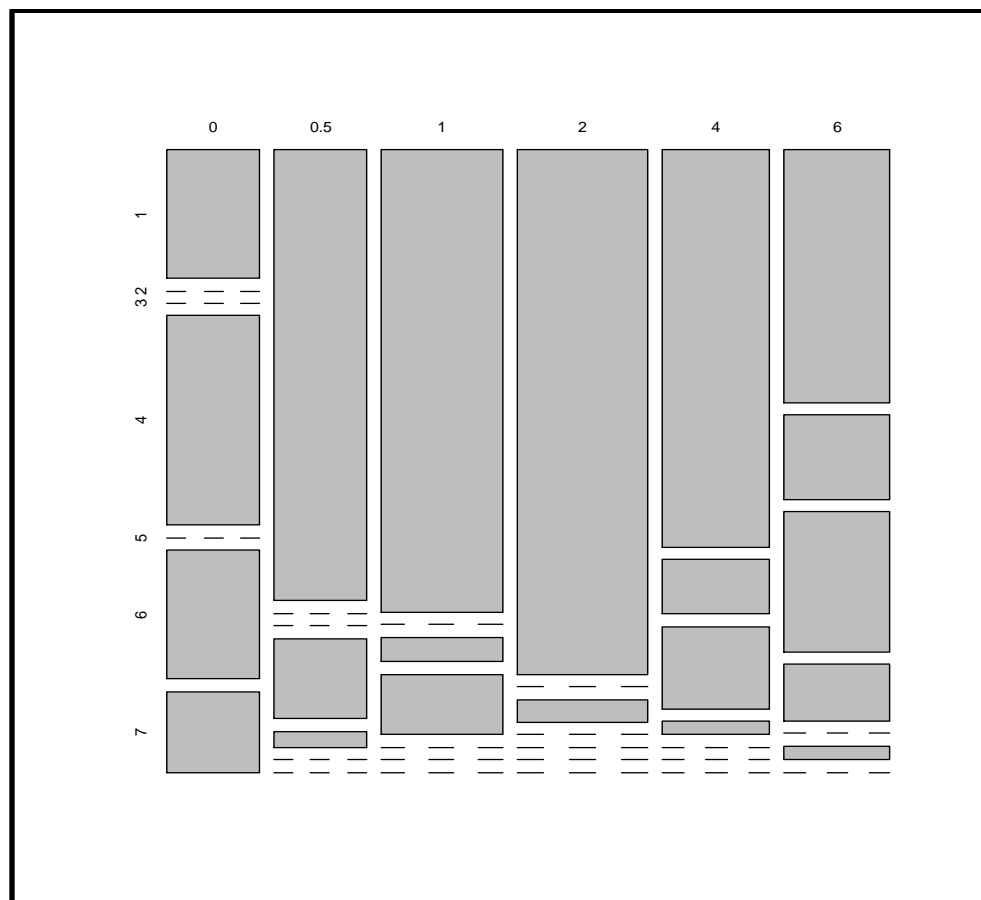
Závěrem statistických výsledků lze pro multipliaci prýtů MN v *in vitro* podmínkách doporučit použití MS média s přidáním BAP v koncentraci 4 mg.L⁻¹.



Obrázek 1: Multiplikace prýtů po 8 týdnech

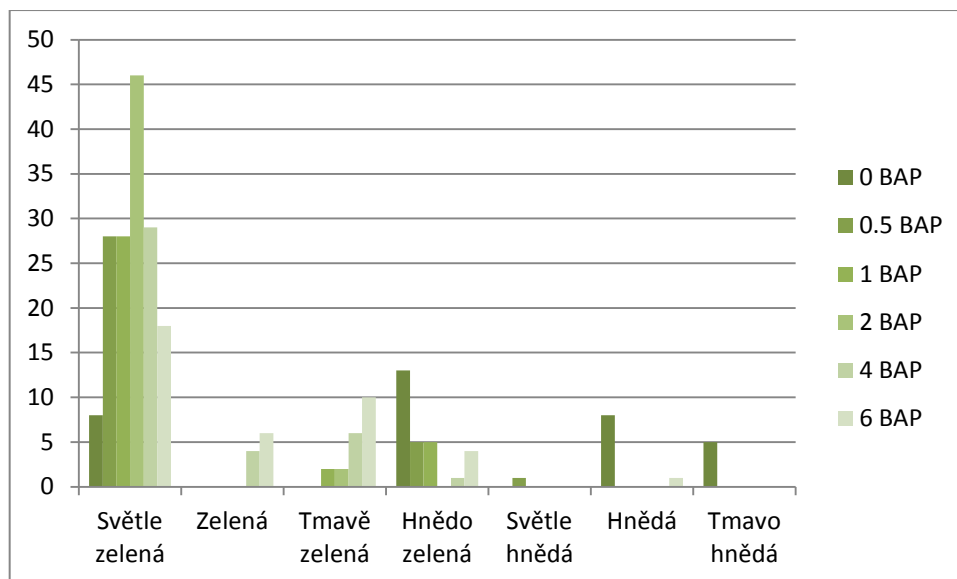
Zdroj: vlastní zdroj

3.2 Analýza barvy listů



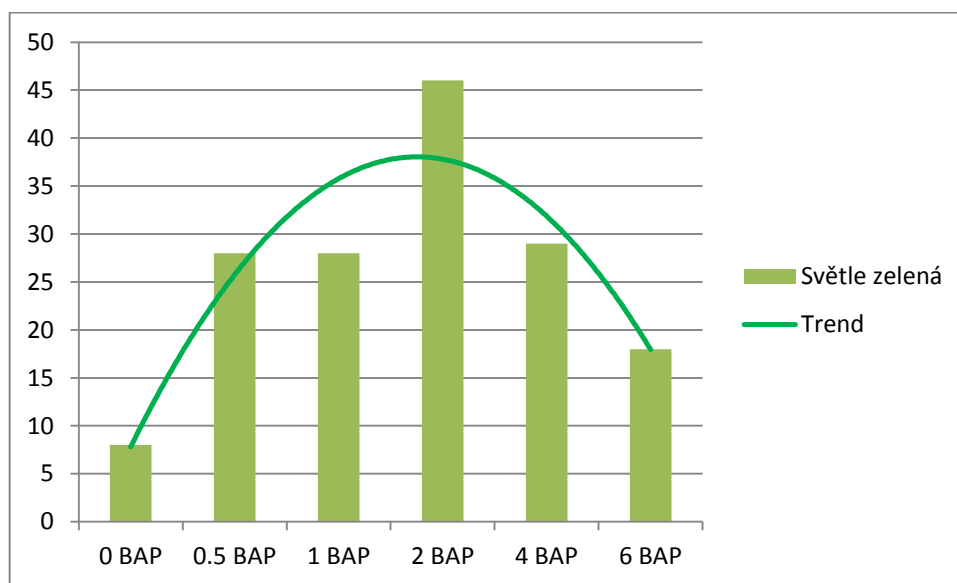
Graf 5: Analýza zastoupenosti definované barvy listů po 8 týdnech,
1=světlezelená,2=zelená,3=tmavězelená,4=hnědozelená,5=světlehnědá,6=hnědá,7=tmavěhnědá

Zdroj: statistický program R



Graf 6: Analýza zastoupenosti barev listů po 8 týdnech

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 7: Analýza zastoupení světlezelené barvy listů po 8 týdnech při různých koncentracích BAP

Zdroj: vlastní zdroj

Okulární pozorování zbarvení listů vypovídá o množství chlorofylu v nich obsaženém, tedy o fotosyntetické aktivitě rostliny a zároveň o jejím zdravotním stavu a vitalitě. Zajímavé na analýze světlezelené barvy listů je, že koresponduje s grafem průměrné

výšky rostlin po 8 týdnech s přidáním BAP (*Graf 1*) a lze tedy tvrdit, že pozitivní výškový průběh růstu je přímo úměrný přirozené světlezelené barvě mladých listů rostlin.

3.3 Zakořeňování

V následujících tabulkách a grafech jsou zaznamenány průměrné hodnoty počtu a délky kořínků po 8 týdnech růstu na poloviční koncentraci MS s fytohormony IBA/NAA v koncentracích 0,0/0,2/0,4/0,8/1,6 mg.L⁻¹.

Analýzou rozptylu bylo potvrzeno, že mezi testovacími a kontrolními vzorky IBA/NAA nebyly zjištěny žádné významné rozdíly na hladině významnosti 0,05 a lze tvrdit, že oba vzorky vykazují stejné či velmi podobné hodnoty zjištěných parametrů.

Tabulka 5: Průměrný počet a délka kořínků po 8 týdnech s IBA

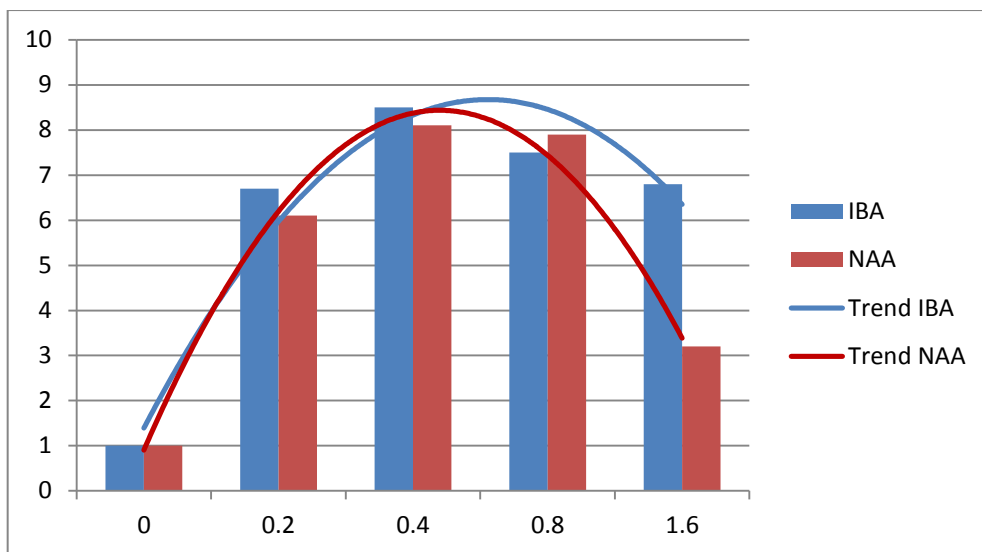
Koncentrace IBA mg.L ⁻¹	Průměrný počet kořínků	Průměrná délka kořínků	Počet rostlin ze 40ti	% úspěšnost kořenění
0	1.0e	1.0e	4.0	10
0.2	3.7d	6.7d	24	60
0.4	4.2c	8.5a	18	45
0.8	7.3a	7.5b	7	17.5
1.6	4.7b	6.8c	10	25

Zdroj: vlastní zdroj

Tabulka 6: Průměrný počet a délka kořínků po 8 týdnech s NAA

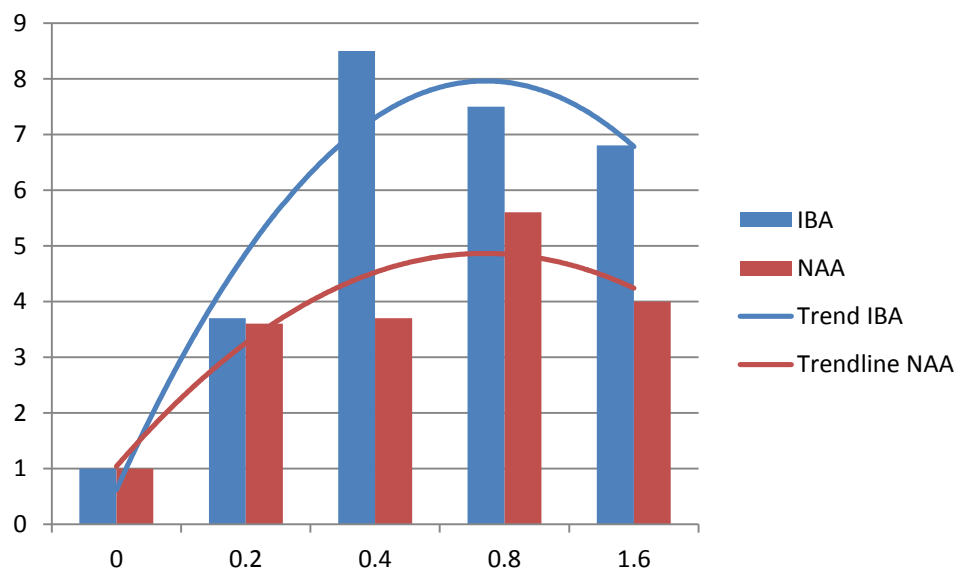
Koncentrace NAA mg.L ⁻¹	Průměrný počet kořínků	Průměrná délka kořínků	Počet rostlin ze 40ti	% úspěšnost kořenění
0	1.0e	1.0e	4	10
0.2	3.6c	6.1c	7	17.5
0.4	3.7b	8.1a	13	32.5
0.8	5.6a	7.9b	9	22.5
1.6	4.0d	3.2d	3	7.5

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 8: Průměrná délka kořínků v cm (osa y) po 8 týdnech s IBA/NAA (osa x)

Zdroj: vlastní zdroj



Graf 9: Průměrný počet kořínků (osa y) po 8 týdnech s IBA/NAA (osa x)

Zdroj: vlastní zdroj

Tabulka 7: Homogenní skupiny délky kořenů a jejich počet na ½ MS média s IBA

0	0.9		0	1	
0.2	26.88		0.2	3.67	
1.6	38.9		0.4	4.22	
0.4	38.94		1.6	4.7	
0.8	57.43		0.8	7.29	

Zdroj: statistický program R

Tabulka 8: Homogenní skupiny délky kořenů a jejich počet na ½ MS média s NAA

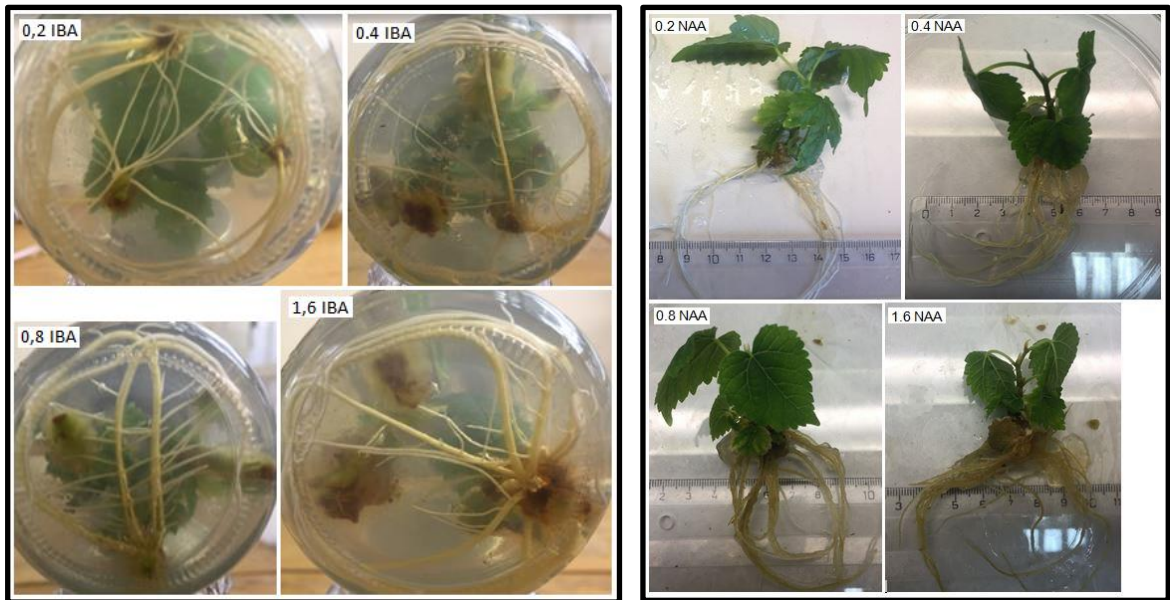
0	0.9		0	1	
1.6	13.33		0.2	3.57	
0.2	24.57		1.6	4	
0.8	42.44		0.8	5.56	
0.4	43.03		0.4	5.67	

Zdroj: statistický program R

V tabulce homogenních skupin pro délku kořínků byla pozitivně hodnocena skupina IBA 0,4/0,8/1,6 mg.L⁻¹ a skupina NAA 0,2/0,4/0,8/1,6 mg.L⁻¹

V tabulce homogenních skupin pro počty kořínků byla pozitivně hodnocena skupina IBA 0,8/1,6 mg.L⁻¹ a skupina NAA 0,2/0,4/0,8/1,6 mg.L⁻¹

Závěrem statistických výsledků lze pro opakované kořenění MN doporučit použití poloviční koncentrace MS média s přidáním IBA 0,4 mg.L⁻¹ vzhledem k délce/počtu kořínků a úspěšnosti kořenění.



Obrázek 2: Kořenění s IBA/NAA po 8 týdnech

Zdroj: vlastní zdroj

3.4 Převod do *ex vitro*, aklimatizace

Explantáty s vyvinutými kořeny byly vyjmuty ze sterilních podmínek sklenic, ošetřeny v roztoku destilované vody a hypermanganu a po zkrácení kořínků na cca 2 cm byly zasazeny v plastových květináčích s nesterilním substrátem. První substrát se skládal z rašeliny, písku a perlitu v poměru 2:1:1 (mix), druhý byl komerční zahradnický substrát Gramfor speciální směs a třetí čistý perlit, aklimatizace následně probíhala v plastových minisklenicích, které udržují stálou vlhkost.

Tabulka 9: Základní tabulka převodu do *ex vitro*

Substrát	% úspěšnost přežití 8 týdnů	Počet rostlin	Průměrná výška po 8 týdnech	Průměrná výška po 4 týdnech
Komerční substrát	100	18	10a	6.1a
Perlit	100	15	4.5b	3.4c
Mix	56	13	4.1c	3.7b

Zdroj: vlastní zdroj

Tabulka 10: Tabulka výběrového měření a vážení nadzemní a pozemní části rostlin po 8 týdnech rostoucích na různých substrátech

	Perlit 4 týdny	Perlit 8 týdnů	Substrát 4 týdny	Substrát 8 týdnů	Mix 4 týdny
Délka kořenové části	10.5	18.5	7.5	15	13
Délka nadzemní části	3.5	8.5	7.5	14	5.5
Váha čerstvá rostl.celkem (g)	1.36	1.82	2.35	4.05	2.08
Váha čerstvé kořenové části (g)	0.48	1.09	1.12	2.03	1.09
Váha čerstvé nadzemní části (g)	0.86	0.8	1.19	1.98	0.92
Váha sušiny celkem (g)	1.02	1.77	1.91	3.46	1.7
Váha sušiny kořenové části (g)	0.39	0.89	1.1	1.87	0.86
Váha sušiny nadzemní části (g)	0.63	0.88	0.81	1.59	0.84

Zdroj: vlastní zdroj

Jako vhodný materiál pro přenos rostlin MN do ex vitro podmínek lze doporučit komerční substrát i perlit, kde bylo dosaženo 100% přežití rostlin po přesazení ve sledované době 4 týdnů. V substrátu tvořeného mixem rašeliny, písku a perlitu byla úspěšnost přežití rostlin pouze 56% a rostlinky viditelně neprospívali oproti čistému perlitu a komerčnímu substrátu.

Z tabulek lze dále konstatovat, že v komerčním substrátu se celkem lineárně rozvíjí kořenový i nadzemní systém, ale u rostlin v perlitu byl po 4. týdnu poměr mezi nadzemní částí a kořínky 3:2. Po 8. týdnu se poměr skokově změnil na očekávaný poměr 1:1, dle hodnot zjištěných u ostatních dvou substrátů, mezi 4 a 8 týdnem tedy proběhlo výrazné rozšíření kořenového systému rostliny na perlitu.



Obrázek 3: Převod kultury na perlit a komerční substrát. Srovnáním první fotografie ihned po zasazení a druhé po 8 týdnech lze vidět rychlejší růst nadzemní části rostlinek na komerčním substrátu

Zdroj: Vlastní zdroj



Obrázek 4: Převod kultury na perlit a komerční substrát. Vlevo kořenový systém MN na perlitu a vpravo na komerčním substrátu po 8 týdnech.

Zdroj: Vlastní zdroj

4 Diskuze

Závěrem statistických výsledků lze pro opakování růstu rostlin MN v *in vitro* podmínkách doporučit použití MS médium s přidáním BAP v koncentraci 2 mg.L^{-1} a pro multipliaci prýtů MS média s přidáním BAP v koncentraci 4 mg.L^{-1} .

Attia et al.(2014) zaznamenali v průběhu 4 týdnů nejvyšší úspěšnost multiplikace prýtů *Morus alba* na MS médiu s přidáním BAP 2 mg.L^{-1} . V tomto časovém horizontu se tedy výsledky shodují a lze potvrdit úspěšnou multiplikaci prýtů na MS médiu s přidáním BAP 1 a 2 mg.L^{-1} . Po 8 týdnu sice výškový graf upřednostňuje opět BAP 2 a 4 mg.L^{-1} , ale v počtu nových prýtů jsou úspěšnější koncentrace BAP $0,5$ a 4 mg.L^{-1} , podle Mehbooba et al. (2011) byl pro růst MN nejvhodnější koncentrace BAP 5 mg.L^{-1} a pro multiplikaci prýtů BAP $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Srovnáním statistiky s výsledky práce Gogoie et al. (2016) u *morus indica* lze zjistit, že hodnoty průměrné délky jsou u BAP 1 a 2 mg.L^{-1} srovnatelné a významnější rozdíl délek, 4 cm versus $2,7 \text{ cm}$ nastalo u koncentrace BAP $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Mehbooba et al. (2011) na rozdíl od výsledků této práce preferuje pro MN koncentrace BAP $0,5/1/2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ jak z hlediska procentuální úspěšnosti multiplikace, tak z průměrných počtů a délek prýtů. Medková (2013) doporučuje k multiplikaci prýtů MN WPM médium s cytokininem MT v koncentraci 1 mg.L^{-1} .

V této práci byly srovnávány účinky cytokininů IBA a NAA na zakořeňování MN v *in vitro* podmínkách. Měřitelné hodnoty byly průběžně zapisovány, z dat byly vytvořeny tabulky a grafy znázorňující vývoj kořenového systému. Závěrem statistických výsledků lze pro kořenění MN doporučit použití poloviční koncentraci MS média s přidáním IBA $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Přidaná koncentrace NAA $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ sice dosahuje podobné délky kořínků, ale jen polovinu počtu, který vznikne s auxinem IBA. Medková (2013) použila pro zakořeňování MN přidané různé druhy fytohormonů THHP, CEP, MT, BAP o jednotné koncentraci 1 mg.L^{-1} na médiu WPN. Nejlépe kořenící explantáty byly zaznamenány s použitím CEP 1 mg.L^{-1} a jako nejméně vhodný byl vyhodnocen BAP, což je logické, protože ten se používá pro stimulaci růstu a větvení prýtů a může

potlačovat vliv auxinů. Attia et al. (2014) popisoval kořenění explantátů na MS médiu s přidáním IBA a ze statistiky vyplývá, že koncentrace 2 mg.L^{-1} IBA u *morus alba* byla hodnocena jako nejlepší z hlediska průměrného počtu 14 kořínků na rostlinu tak 70% úspěšnosti kořenění. Statistické výsledky kořenění MN v dokumentu od Mehbooba et al. (2011) pro koncentrace IBA 2 a 3 mg.L^{-1} jsou velmi podobné výsledkům s koncentrací IBA $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ v této práci, ale s menší procentuální hodnotou počtu kořínků na rostlinu, která u MN vyšla až jako třetí nejlepší možnost. Jako nejlepší volbu pro kořenění *morus indica* předkládají Gogoi et al. (2016) poloviční koncentraci MS s přidáním AC 5 g.L^{-1} společně s NAA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ s výsledkem průměru délky kořínků 3,07 cm a průměrem kořenů na rostlinu 21,11 cm.

Při analýze barvy listů lze najít korelaci mezi výškou a okulárně pozorovanými zdravými světlezelenými listy rostlinek. Takové srovnání jsem v dalších dokumentech mikropropagace nenalezl, Marcotrigiano et al. (1990) se zabývali zjišťováním a slovním popisem rozdílů mezi listy mateřské rostliny a rostlin vypěstovaných in vitro několika kultivarů Kopřivy africké (*Coelus hybridus*) bez vztažení těchto výsledků k různým koncentracím přidaných fytohormonů do MS média.

5 Závěr a shrnutí

V této práci byly srovnány účinky auxinu BAP na růst a multiplikaci prýtu a cytokininů IBA a NAA na kořenění MN. Pozorovatelné výsledky byly průběžně zapisovány, z dat byly vytvořeny tabulky a grafy znázorňující vývoj délek, počtu nových prýtků, barvy listů, velikosti kalusu na bázích explantátů. Tato práce měla za cíl zjistit vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné a 1-naftyloctové na tvorbu adventivních prýtků a kořenů u *Morus nigra* L. v *in vitro* podmínkách a tento cíl byl splněn, ačkoli srovnání s výstupními hodnotami z jiných prací je jasné, že nejen každý druh, ale i každý kultivar morušovníku vyžaduje jinak připravené umělé podmínky pro obnovu *in vitro*. Zisk dat a jejich zpracování zodpovědělo prvotní otázku, jaké koncentrace cytokininů a auxinů přidaných do MS respektive poloviční koncentrace MS média, jsou nejvhodnější pro elongaci, multiplikaci prýtků a růstu kvalitního kořenového systému rostlin MN a která budou vhodná pro další použití a případnou kultivaci podobné kultury v komerčním prostředí. Pro další vývoj v této problematice, za účelem získu relevantních dat a zkušeností, lze navrhnout testování růstových fází prýtků na dalších komerčních cytokininech, jejich variant koncentrací, různých médiích s dalšími specifickými změnami obsahu dodaných vitamínů a zdrojů energie a jejich případných kombinacích. Stejným způsobem je možné postupovat u auxinů pro kořenění rostlin a již tento krátký vhled nabízí širokou škálu možných postupů, dále je možné aplikovat jiné formy fotoperiody v kultivační místnosti nebo změnu teploty a kombinace již uvedených auxinů a cytokininů. Dále je možné otestovat různé způsoby ošetření rostlin v *ex vitro* podmínkách pomocí chemických a biologických přípravků.

Rozmanitost kombinačních faktorů výše uvedeného, které mohou napříště vstoupit do budoucích fází testování, je velká. Úspěšné postupy bude možné opakovat, vylepšovat a získávat z malých zdrojů velký užitek. To se bude samozřejmě týkat i dalších dřevin, nejen ovocného stromu, kterým je morušovník černý.

Cíle této práce byly splněny, bylo zjištěno, které přidávané fytohormony a v jakých koncentracích jsou vhodné pro množení a kořenění MN metodou *in vitro*, byly zjištěny trendy vývoje na jednotlivých koncentracích hormonů, tedy jejich pozitivní a negativní vliv na růst.

6 Přehled literatury a zdrojů

- Prknová H. : Rozmnožování vybraných druhů dřevin in vitro, 2008, Dizertační práce, [online], [cit. 2018-03-20] <https://www.fld.czu.cz/dl/46943?lang=cs>
- Clinovishi F.: Dendrologie, 2005, Suceava, Romania, [online],[cit. 2018-03-20] <http://silvic.usv.ro/cursuri/dendrologie.pdf>
- Procházka S., Šebánek J. : Regulátory rostlinného růstu, 1997, 1. vydání Praha Academica, ISBN 80-200-0597-8.
- Mikuška B. : Výskyt moruše čiernej (morus nigra) v okolí Pukanca, 2002, Diplomová práce,, [online], [cit. 2018-03-20] http://www.pukanec.sk/download_file_f.php?id=272545
- Kiran K., Thorpe A. : In vitro propagation of mulberry (Morus alba L.) through nodal segments, Scientia Horticulturae, Volume 42, Issue 4, 1990, Pages 307-320, ISSN 0304-4238 [online],[cit. 2018-03-23] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030442389090054I>
- Mehbooba Z., Zahoor A. ,Shafi M., Micropropagation of Morus nigra L. From Nodal Segments with Axillary Buds, 2011, ISSN 1817-3047, [online],[cit. 2018-03-23] <https://pdfs.semanticscholar.org/afbc/b9d6d505c11fc33e6b4ca2139b90570c2b8f.pdf>
- Sedlák, J.; Paprstein, F.: IN VITRO MULTIPLICATION OF OLD PEAR CULTIVARS, 2015, Acta Hort. 1094, 163-167, DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1094.20, [online],[cit. 2018-03-26] <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1094.20>
- S. K. Pattnaik, Y. Sahoo, P. K. Chand: Micropropagation of a fruit tree, Morus australis Poir. syn. M. acidosa Griff. rev.1996, [online],[cit. 2018-03-26] <https://rd.springer.com/article/10.1007/BF00233153>

- Anis M., Faisal M., Singh S.K.: Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Through In vitro Culture of Shoot tip and Nodal Explants, 2003, , [online],[cit. 2019-02-26] <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.483.9517&rep=rep1&type=pdf>
- Kavyashree R: A repeatable protocol for in vitro micropropagation of mulberry variety S54, [online],[cit. 2018-04-03]<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/3043/1/IJBT%20%283%29%20385-388.pdf>
- Murashige T., Skoog F. : A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, rev. 1962, [online],[cit. 2018-04-03]<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Frébort I., Kowalská M., Hluska T.: Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*. 2011-05-01, roč. 62, čís. 8, s. 2431–2452. PMID: 21321050. [online] [cit. 2018-04-16] <https://academic.oup.com/jxb/article/62/8/2431/479405>
- Takashi K., Nanae U., Masahiko M. : Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. Roč. 445, čís. 7128, s. 652–655. [online][cit. 2018-04-16] <https://www.nature.com/articles/nature05504>
- Kopecká J., Rotková G.: Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií Brno: Masarykova univerzita. ISSN 1802-128X. 2017 [online][cit.2018-08-14] <http://elportal.cz/publikace/cviceni-mikrobiologie>
- Bischof H., Sus J.: Řez ovocných stromů a keřů, 1998, ISBN 978-80-7360-935-1
- Kováč J.: Explantátové kultury rostlin, Univerzita Palackého, Olomouc 1995, str.142
- Spohn Margot; Spohn Roland: Stromy, 2008, ISBN 978-80-242-4720-5
- Větvička V.: Stromy a keře, moje životní láska, 2017, ISBN: 978-80-7442-093-1
- Cibulka J.: Domácí vína, piva, likéry a medoviny, 2003, ISBN 80-86681-23-8
- Dolejš A.; Kott V.; Šenk L.: Méně známé ovoce, 1991
- Ústřední seznam ochrany přírody (ÚSOP). Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky [online]. [cit. 2018-10-01] <https://www.drusop.nature.cz>

- Agentura ochrany a přírody České republiky: Památné stromy [online]. [cit. 2017-01-27]. Dostupné z: <http://www.ochranaprirody.cz/obecna-ochranaprirody-a-krajiny/pamatne-stromy/>
- Medková M., Vliv různých druhů cytokininů na zakořeňování moruše černé *in vitro*, 2013 [online][cit.2018-11-14] Dostupné z: <https://socv2.nidv.cz/archiv35/getWork/hash/0734f0a4-915a-11e2-b1f8-faa932cbcfda>
- Šebánek J., Sladký Z., 1988: Biotechnologie rostlinných explantátů . Vysoká škola zemědělská Brno: 100 s.
- Hradilík, J. (2005). Rostlinne explantaty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
- Kamenická A., Rypák M., 1989: Explantáty v rozmnožování dřevín. Veda vydavateľstvo Slovenskej akademie vied Bratislava: 158 s.
- Chalupa V., 1989: Plant regeneration by static embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*) a Sessile oak (*Quercus petraea*). Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca, 16: 135-143
- Kincl L., Kincl M., Jarklová J., 2008: Biologie rostlin, Fortuna, ISBN 80-7168-947-5 <http://www.kakusui.jp/>
- Havliš M., Morus nigra: Moruše černá, [online] 2010 [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: <http://www.havlis.cz/karta.php?kytkaid=1111>
- Lánský P., Morušová zahrada, [online] 2014 [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: <https://www.morusovazahrada.cz/2017/01/mapa-morusovniku.html>
- Metodické listy OPVK [online]. [cit. 2018-11-07]. Dostupné z: http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A8_Vyuziti_in_vitro_biotechnologii.pdf
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Anthony S., 2009, Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0, [online] [cit. 2018-11-08]. Dostupné z: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>

Koyuncu F., 2004, Breaking seed dormancy in black mulberry (*Morus nigra* L.) by cold stratification and exogenous application of gibberellic acid, [online] [cit. 2019-04=08]. Dostupné z:

<https://pdfs.semanticscholar.org/3bb6/f89384f18650a02e8f893818ccf5fb4f73c7.pdf>

MarcotrigianoM., Bozle T.H., Morgan P.A., Ambach K.L., 1990, Leaf color variants from Coelus shoot cultures, [online] [cit. 2019-04=08]. Dostupné z:

<https://journals.ashs.org/jashs/view/journals/jashs/115/4/article-p681.pdf>

Další internetové zdroje:

<http://krishikosh.egranth.ac.in/bitstream/1/5810005086/1/Shabir%20Ahmad%20Wani.pdf> [online]. [cit. 2018-05-14].

<https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3495/> [online]. [cit. 2019-03-25].

<https://homeguides.sfgate.com/lifespan-mulberry-trees-61028.html> [online]. [cit. 2018-02-21].

<https://botany.cz/cs/morus-nigra/> [online]. [cit. 2019-01-29].

<http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=829> [online]. [cit. 2018-11-04].

<http://docplayer.cz/19105163-Vliv-ruznych-druhu-cytokininu-na-zakorenovani-moruse-cerne-in-vitro.html> [online]. [cit. 2019-02-04].

<https://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/morusovnik-cerny-bily-cervený-obrmezi-ovocnými-stromy/?pid=15360> [online]. [cit. 2019-02-07].

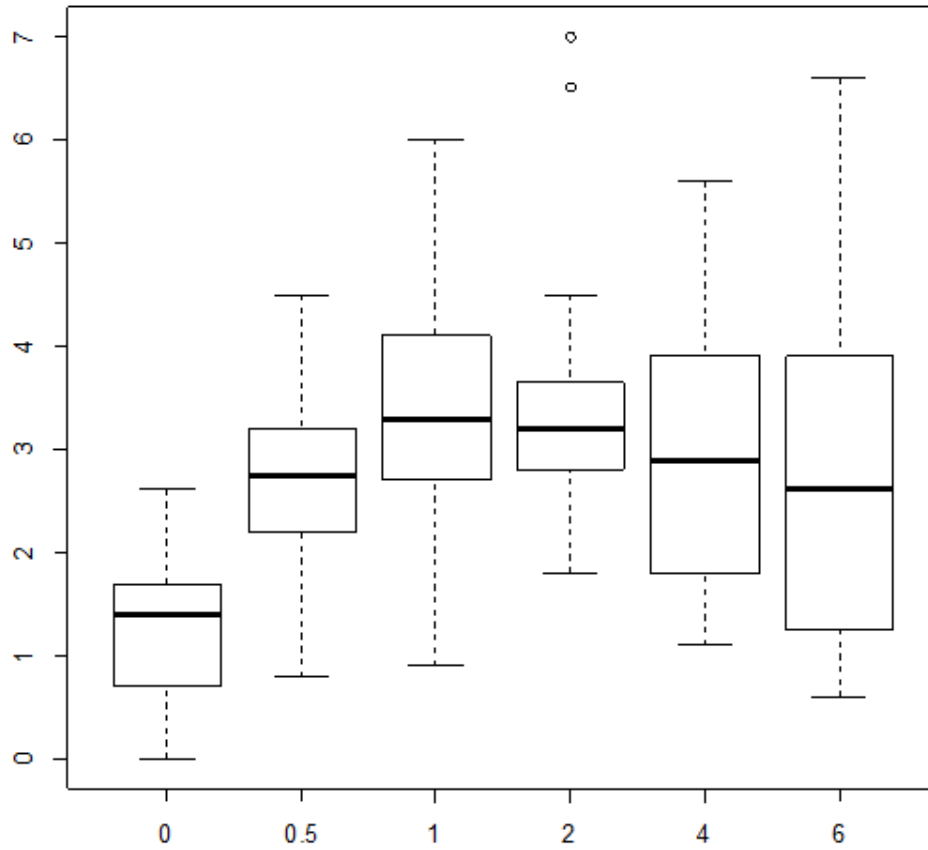
7 Přílohy

Příloha A: Složení kultivačního MS média

<i>Makroelementy:</i>	mg.L-1	<i>Mikroelementy:</i>	mg.L-1	Organická složka	mg.L-1
KNO ₃	1 900	MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,3	Inositol	100
NH ₄ NO ₃	1 650	H ₃ BO ₃	6,2	kyselina nikotinová	0,5
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6	Thiamin	0,1
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	pyridoxin	0,5
KH ₂ PO ₄	170	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	Glycin	2
<i>Železo:</i>		CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	sacharosa	15000-30000
Na ₂ EDTA	37,3	KI	0,83	Agar	6000-8000
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,8				

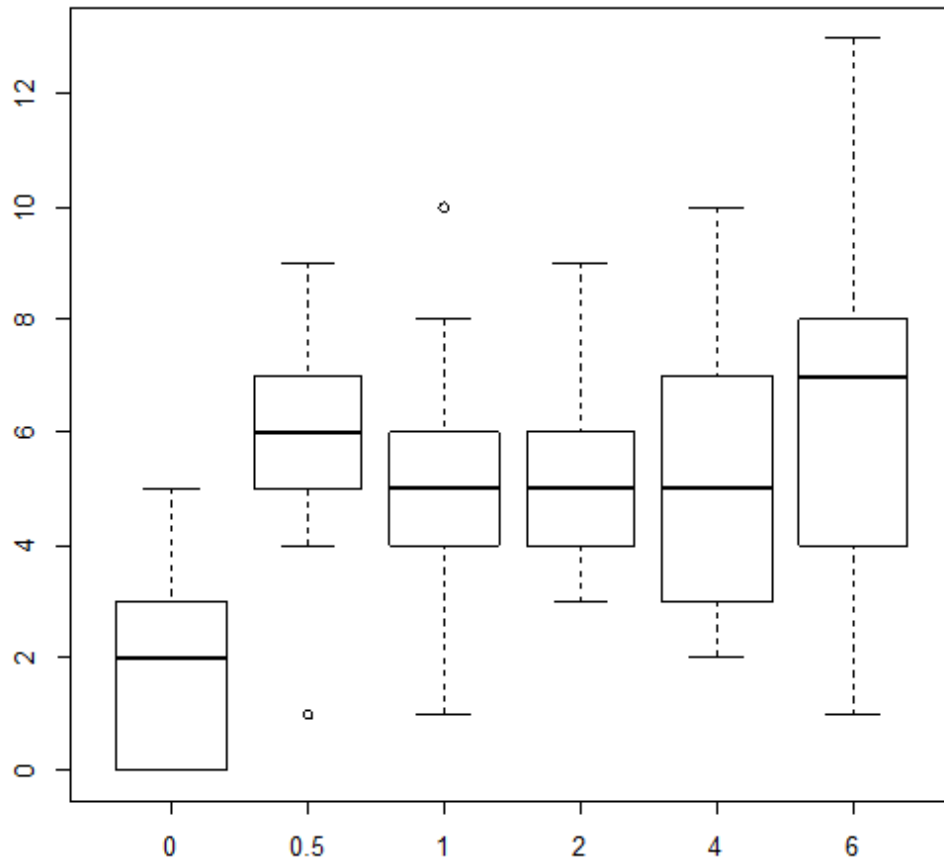
Zdroj: Murashige, Skoog 1962

Příloha B: Průměrné výšky rostlinek na různých koncentracích BAP po 8 týdnech



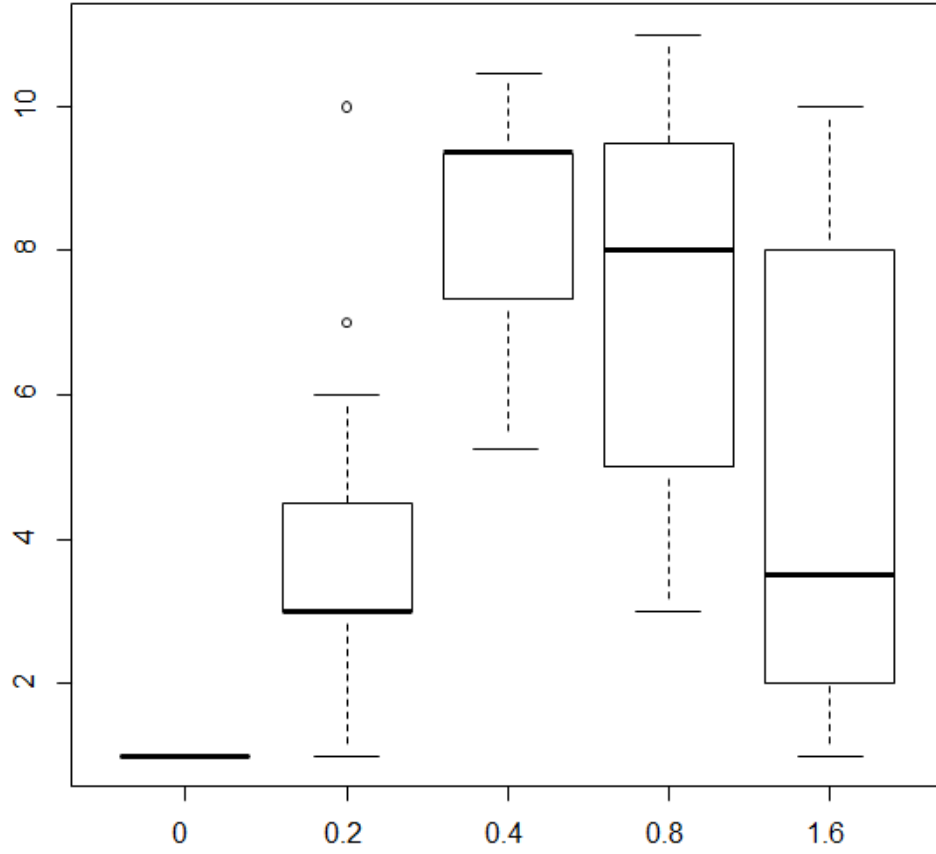
Zdroj: Program R

Příloha C: Průměrný počet prýtků na různých koncentracích BAP po 8 týdnech



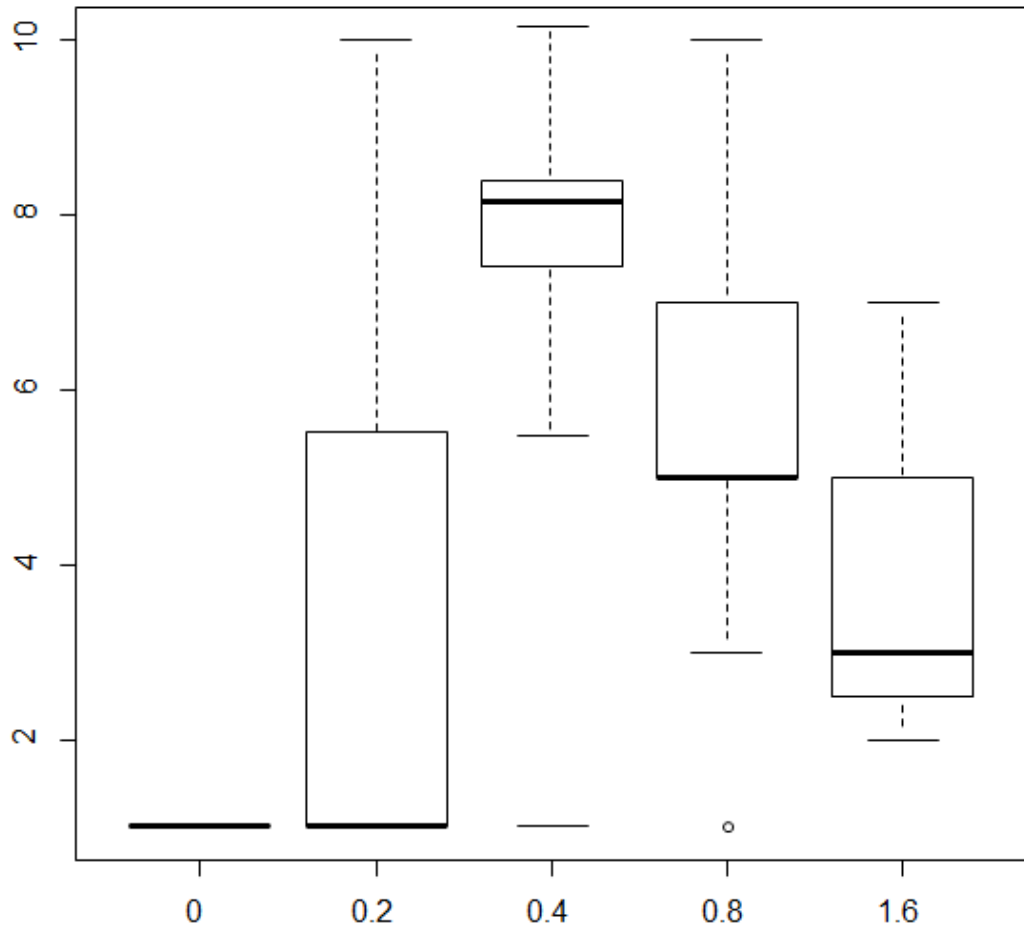
Zdroj: Program R

Příloha D: Průměrná počet kořínků na různých koncentracích IBA po 8 týdnech



Zdroj: Program R

Příloha E: Průměrný počet kořínků na různých koncentracích NAA po 8 týdnech



Zdroj: Program R

Příloha D: Tabulka celková použitých koncentrací a výsledků růstu a kořenění

				cm	cm	cm	cm	%	%
MS	BAP	IBA	NAA	výška 4t	výška 8t	prýty 4t	prýty 8t	vitřif 8t	kalus 8t
1	0	0	0	1,42d ±0,24	1,57f ±0,3	1,60f	2,24f	4,4	6,6
1	0.5	0	0	1,61c ±0,49	2,67e ±0,62	2,69d	6,11b	2,7	0
1	1	0	0	1,82b ±0,65	3,34a ±0,93	3,28a	5,08e	15,5	13,7
1	2	0	0	1,90a ±0,47	3,32b ±0,67	3,23b	5,10d	8,3	13,1
1	4	0	0	1,28f ±0,81	3,00c ±1,04	2,65e	6,28a	25	15
1	6	0	0	1,34e ±0,89	2,69d ±1,43	2,95c	5,95c	38,1	50
MS	BAP	IBA	NAA	kořeny počet	kořeny délka	počet	%		
0.5	0	0	0	1.0e	1.0e	4	10		
0.5	0	0.2	0	3.7d	6.7d	24	60		
0.5	0	0.4	0	4.2c	8.5a	18	45		
0.5	0	0.8	0	7.3a	7.5b	7	17.5		
0.5	0	1.6	0	4.7b	6.8c	10	25		
0.5	0	0	0.2	3.6c	6.1c	7	17.5		
0.5	0	0	0.4	3.7b	8.1a	13	32.5		
0.5	0	0	0.8	5.6a	7.9b	9	22.5		
0.5	0	0	1.6	4.0d	3.2d	3	7.5		

Zdroj: vlastní zdroj