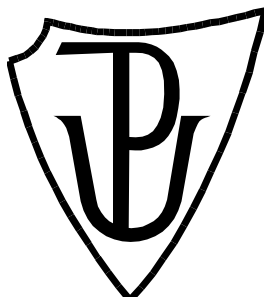


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



Katedra botaniky

**Biotechnologické metody u apomiktických druhů  
ostružiníků  
(*Rubus spp. div.*)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Bc. Lenka Richterová

Studijní obor: Učitelství biologie pro střední školy - Učitelství  
geologie a ochrany životního prostředí pro střední školy

Forma studia: prezenční

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Olomouc 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Boženy Navrátilové, Ph.D. a s užitím uvedené použité literatury.

V Olomouci

.....

Bc. Lenka Richterová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. za konzultace a velmi užitečné a cenné rady při psaní mé diplomové práce a při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině, která mě během mého studia velmi podporovala.

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Lenka Richterová

**Název práce:** Biotechnologické metody u apomiktických druhů ostružiníků (*Rubus spp. div.*)

**Typ práce:** Diplomová práce

**Pracoviště:** Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, katedra botaniky

**Vedoucí práce:** RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2014

### **Abstrakt:**

Apomixie, jakožto převládající způsob rozmnožování u rodu *Rubus sp.*, je zvláštním typem reprodukce, při kterém nedochází k oplození. Z tohoto důvodu si ostružiníky udržují relativně neměnnou genetickou informaci, a proto jsou také velice špatně taxonomicky zařaditelné. Cílem této práce je usnadnění výzkumu tetraploidního druhu *Rubus bifrons* pomocí optimalizace biotechnologických metod. Kultivací semeníků, gyneceí, laterárních pupenů lze získat dospělé rostliny. Tato diplomová práce se zaměřuje především na kultivaci prašníků rostlin *Rubus bifrons*, jelikož právě tímto způsobem lze získat jedince s poloviční sadou chromozomů – dihaploidy. Před kultivací jednotlivých prašníků byla změřena jejich velikost a také stádium mikrosporogeneze pylových zrn. Měřením prašníků a pozorováním pylových zrn lze usoudit, že pro kultivaci prašníků jsou nejvhodnější prašníky, obsahující pylová zrna v jednojaderném vývojovém stádiu. Pomocí explantátových kultur z rostlin *Rubus bifrons* jsme získali 19 kusů kalusů, indukce kalusů ze semeníků a gyneceí bylo rovněž úspěšné, podobně jako regenerace laterárních pupenů. Výsledkem této práce je také výběr nejvhodnějších sterilizačních postupů a složení kultivačních médií, které by indukovali regeneraci rostlinných explantátů *Rubus bifrons*.

**Klíčová slova:** apomixie, kultivace prašníků, *Rubus bifrons*, kultivační média, biotechnologické metody

**Počet stran:** 62

**Počet příloh:** 7

**Jazyk:** Čeština

## **Bibliographical identification**

**Autor's name and surname:** Bc. Lenka Richterová

**Title:** Biotechnological methods by apomictic brambles (*Rubus spp. div.*)

**Type of thesis:** Master

**Institution:** Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany

**Supervisor:** RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D

**The year of presentation:** 2014

### **Abstract:**

Apomixis, a prevailing type of reproduction of the *Rubus bifrons*, is a special case of reproduction which doesn't result in fertilization. This is the reason why blackberry plants hold a relative invariant genetic information. Hence they are also hardly taxonomically classifiable. A goal of the thesis was to simplify a research of *Rubus bifrons* using optimization of biotechnologic methods. Cultivation of ovaries, gynoeciums and lateral buds allow gaining adult plants. This thesis focuses especially on the cultivation of anthers of tetraploid species *Rubus bifrons*. Via described cultivation protocol we were able to plant individuals with the half set of chromosomes - dihaploids. Before the cultivation of these separate anthers both their size and microsporogenetic stage of pollen grains were measured. By measurement of anthers and by observing of pollen grains a hypothesis could be stated that for the anthers-cultivation the most appropriate ones are the anthers containing pollen grains in a mononuclear developing stage. Using plant tissue cultures of *Rubus bifrons* 19 pieces of calluses were obtained. Induction of calluses from ovaries and gynoeciums as well as regeneration of lateral buds were successful. The outcome of this thesis is therefore defining of the most appropriate sterilization processes and the composition of cultivating media which would induce regeneration of plant tissues of *Rubus bifrons*.

**Keywords:** apomixis, anther culture, *Rubus bifrons*, culture media, biotechnological methods

**Number of pages:** 62

**Number of appendices:** 7

**Language:** Czech

## Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	10
<b>2. Cíle práce</b> .....	12
<b>3. Literární přehled</b> .....	13
3.1. Čeleď růžovité ( <i>Rosaceae</i> ) .....	13
3.2. Charakteristika rodu <i>Rubus</i> .....	15
3.2.1. Ostružiník dvojbarevný ( <i>Rubus bifrons</i> ) .....	18
3.3. Taxonomická klasifikace ostružiníků.....	19
3.4. Apomixie .....	20
3.5. Biotechnologické metody u rostlin .....	22
3.5.1. Techniky explantátových kultur u čeledi <i>Rosaceae</i> .....	23
3.5.2. Prašníkové kultury rostlin .....	23
<b>4. Materiál a metody</b> .....	26
4.1. Rostlinný materiál .....	26
4.1.1. Odběr pupat a laterálních pupenů.....	26
4.2. Experimenty .....	27
4.2.1. Vývojové stádium pylových zrn .....	28
4.2.2. Stanovení životaschopnosti pylových zrn .....	30
4.3. Sterilizace rostlinného materiálu .....	30
4.3.1. Sterilizace pupat <i>Rubus bifrons</i> .....	31
4.3.2. Sterilizace laterálních pupenů <i>Rubus bifrons</i> .....	31
4.4. Izolace prašníků, semeníků a gyneceí .....	32
4.5. Kultivace rostlinného materiálu .....	33
4.5.1. Kultivace prašníků, semeníků a gyneceí u <i>Rubus bifrons</i> .....	33
4.5.2. Kultivace laterálních pupenů <i>Rubus bifrons</i> .....	36

<b>5. Výsledky</b> .....	37
5.1. Stanovení vývojového stádia pylových zrn .....	37
5.2. Stanovení životnosti pylových zrn .....	37
5.3. Sterilizace pupat <i>Rubus bifrons</i> .....	38
5.4. Kultivace prašníků <i>Rubus bifrons</i> .....	39
5.5. Kultivace semeníků a gyneceí u <i>Rubus bifrons</i> .....	41
5.6. Kultivace laterálních pupenů u <i>Rubus bifrons</i> .....	43
5.7. Indukce organogeneze <i>in vitro</i> .....	43
<b>6. Diskuze</b> .....	44
6.1. Sterilizace rostlinného materiálu .....	44
6.2. Složení kultivačních médií .....	45
6.3. Indukce organogeneze <i>in vitro</i> .....	47
6.4. Využití biotechnologických metod u rodu <i>Rubus sp.</i> .....	48
<b>7. Závěr</b> .....	49
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	50
8.1. Seznam použitých internetových zdrojů .....	55
<b>9. Přílohy</b> .....	56
Příloha 1- <i>Rubus bifrons</i> na pozemcích katedry botaniky .....	56
Příloha 2- Fotodokumentace rostinného materiálu .....	57
Příloha 3- Izolované kultury <i>Rubus bifrons</i> .....	58
Příloha 4- Fotodokumentace kalusů z prašníků, semeníků a gyneceí .....	59
Příloha 5- Fotodokumentace kalusů ze semeníků a gyneceí .....	60
Příloha 6- Regenerace laterálních pupenů <i>Rubus bifrons</i> .....	61
Příloha 7- Časový harmonogram experimentů .....	62

## Seznam obrázků a fotografií:

<b>Obrázek 1:</b> Souplodí nažek na zdužnatělém květním lůžku u jahodníku (převzato z Hadač, 1967).....	13
<b>Obrázek 2:</b> Květní diagram jahodníku ( <i>Fragaria sp.</i> ) (převzato z Hadač, 1967).....	13
<b>Obrázek 3:</b> Zástupci čtyř poddruhů, rostoucí v České republice:.....	17
<b>Obrázek 4:</b> <i>Rubus bifrons</i> a) květ b) detail květu .....	18
<b>Obrázek 5 A, B:</b> Pozemek katedry botaniky PřF UP Olomouc v Holicích s rostlinami <i>Rubus bifrons</i> (Lenka Richterová, 2012).....	26
<b>Obrázek 6:</b> Laterální pupeny <i>Rubus bifrons</i> (foto: Božena Navrátilová) .....	27
<b>Obrázek 7:</b> Poupata z donorových rostlin <i>Rubus bifrons</i> .....	27
<b>Obrázek 8:</b> Rozdrcené prašníky a uvolněná pylová zrna <i>Rubus bifrons</i> na podložních sklech.....	29
<b>Obrázek 9:</b> Pylové zrno z pupat <i>Rubus bifrons</i> o velikosti 6 mm barvené acetokarmínem (zvětšení 400x) .....	29
<b>Obrázek 10:</b> Pylová zrna ve stádiu 1- jaderné mikrospory ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 (zvětšení 10x10).....	29
<b>Obrázek 11:</b> Ošetření pupat v 70% etanolu .....	31
<b>Obrázek 12:</b> Ošetření pupat v 2,5% chloraminu B .....	31
<b>Obrázek 13:</b> Segmenty <i>Rubus bifrons</i> na ½ MS médiu (foto: Božena Navrátilová).....	32
<b>Obrázek 14:</b> Životnost pylových zrn u <i>Rubus bifrons</i> .....	38
<b>Obrázek 15:</b> Vliv 8 variant médií na vznik kalusů z prašníků <i>Rubus bifrons</i> (po dvou měsících kultivace).....	41



## Seznam tabulek:

<b>Tabulka 1:</b> Složení médií pro kultivaci prašníků, semeníků a gyneceí u <i>Rubus bifrons</i> .....	34
<b>Tabulka 2:</b> Složení médií pro indukci organogeneze z kalusu .....	36
<b>Tabulka 3:</b> Průběh hodnocení kultivace prašníků u <i>Rubus bifrons</i> .....	40
<b>Tabulka 4:</b> Hodnocení kultivace nezralých semeníků a celých apokarpických gyneceí u <i>Rubus bifrons</i> .....	42

## Seznam použitých zkratk

<b>NLN</b>	NLN médium (Lichter, 1981)
<b>FDA</b>	fluorescein diacetát
<b>BAP(BA)</b>	6-benzylaminopurin (benzyladenin)
<b>IAA</b>	indolyl-3-octová kyselina
<b>NAA</b>	$\alpha$ -naftyloctová kyselina
<b>IBA</b>	indolyl-3-máselná kyselina
<b>2, 4- D</b>	kyselina dichlorfenoxyoctová
<b>kinetin</b>	N6-furfurylaminopurin
<b>MS</b>	Murashige a Skoog (1962)
<b>NN</b>	Nitsch a Nitsch (1969)
<b>B5</b>	Gamborg (1968)
<b>N6</b>	Chu (1968)

# 1. Úvod

Schopnost sexuální reprodukce umožňuje rostlinám i živočichům produkovat geneticky odlišné potomstvo. Tato genetická variabilita je určitou biologickou výhodou a takto vzniklým jedincům napomáhá k evolučnímu vývoji. V dnešní rozmanité přírodě však existují organismy, pro které je tento typ reprodukce nevýhodný či nemožný, ať už z důvodu chybějícího partnera, nepříznivých životních podmínek nebo z důvodů evoluční adaptace.

V rostlinné říši (*Plantae*) lze nalézt druhy rostlin, u kterých je převládajícím způsobem reprodukce tzv. nepohlavní rozmnožování. Tento typ reprodukce má určité odlišné formy, jako je například vegetativní rozmnožování a tzv. agamospermie neboli apomixie. Vegetativní rozmnožování je umožněno tím, že rostlinné buňky jsou totipotentní – z každé rostlinné buňky může potenciačně vzniknout nový jedinec. Tito potomci vytváří klon a mají shodný genotyp s mateřskou rostlinou. Při agamospermii nedochází ke splývání gamet – noví jedinci vznikají z různých buněk mateřské rostliny, např. z antipod vajíčka, synergid vajíčka, nucellu, neoplozené oosféry (Vinter, 2012). Agamospermii poprvé popsal roku 1841 J. Smith u australské rostliny *Alchornea ilicifolia* pěstované v botanické zahradě Kew Gardens. Pro Smithe nebylo těžké dojít k závěru, že se semena vyvinula bez oplození, neboť kolekce v Kew sestávala výhradně ze samičích rostlin. Od té doby byly detailně prostudovány další případy [studium apomixie u rodu ostružiník (*Rubus*), jeřáb (*Sorbus*), jestřábník (*Hieracium*), pampeliška (*Taraxacum*) ], takže se podařilo dospět k důležitým zobrazením: za prvé, apomixie je u vyšších rostlin velmi častá, jak u kaprad'orostů, tak i u krytosemenných rostlin, neznáme však žádné apomiktické nahosemenné rostliny. Za druhé známe čeledi, u nichž je apomixie velmi rozšířena v celé řadě rodů. Známými příklady z flory mírného pásu severní polokoule jsou růžovité (*Rosaceae*) a hvězdicovité (*Asteraceae*) (Briggs a Walters, 2001).

Ostružiníky (*Rubus* sp.) jsou pro studium zajímavé svým charakteristickým typem rozmnožování, ale tento rod je také velmi oblíben u lidské populace, neboť patří k ovocným rostlinám, poskytující plody vhodné k jídlu. Tyto vytrvalé byliny nebo keře patří k druhově nejbohatším rodům květeny České republiky a zároveň k nejkritičtější taxonomickým skupinám ve střední Evropě. Základními příčinami jsou vysoký počet druhů, nejasné ohraničení druhů ve flórových oddílech i celkově nízká znalost druhového složení ostružiníkových flor jak v České republice, tak i v sousedních zemích. Hlavní příčiny, které ostružiníky řadí mezi nejkritičtější skupiny jsou: neúplná (fakultativní) apomixie, vysoký stupeň hybridizace a zvláště rozpad hybridního potomstva do celé řady různých hybridogenních produktů (Slavík, 1995). V dnešní době je na území České republiky

rozlišováno více než 80 druhů ostružiníků a jak bylo zmíněno, kvůli komplikovanému rozmnožování je jejich taxonomie a určování velice obtížné (Koblížek a kol., 2009). Na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se již řadu let zabývají taxonomií různých druhů ostružiníků (například druhů ze skupiny *Rubus* ser. *Radula*) a mimo jiné také tetraploidního druhu *Rubus bifrons*. Pomocí metody průtokové cytometrie bylo zjištěno, že tento druh se rozmnožuje převážně apomikticky a byly detekovány tyto typy apomixie a její modifikace: aposporie- aposporická pseudogamie, aposporická pseudogamie s polyspermií; a hypoteticky diplosporie (Truhlářová, 2012).

Tato diplomová práce má rozšířit výzkum druhu *Rubus bifrons* využitím biotechnologických metod- prašnickové kultury, kultury nezralých semeníků, kultury celých apokarpických gynecií a kultury laterálních pupenů. Při kultivaci a regeneraci prašnickových kultur lze indukovat vznik kalusů s následnou organogenezí. Tímto způsobem regenerované rostliny budou haploidní (v případě *Rubus bifrons* dihaploidní) a tyto rostliny mohou být dále využity pro výzkum nebo k získání čistých homozygotních linií. Dihaploidní rostliny (DH), které mohou být indukovány spontánně nebo pomocí kolchicinu, poskytují následně šlechtitelům čisté homozygotní linie, které si nejméně na čtyři generace fixují vhodné znaky (El- Hennawy a kol., 2011). Haploidní a dihaploidní regeneranti se též mohou využívat k transformacím a molekulárním analýzám. Další možnosti využití představuje časná selekce specifických znaků, stabilizace mezidruhových hybridů, genetické analýzy, mutace a selekce *in vitro* - např. na obsah mastných kyselin, rezistenci vůči chorobám, mrazuvzdornost apod. (Vyvadilová a kol., 2008).

Biotechnologické metody jsou založeny na izolaci rostlinných buněk, pletiv, orgánů a na jejich kultivaci ve sterilních podmínkách. Jako materiál pro kultivaci *in vitro* je možné teoreticky použít jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem. Mohou to být vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, reprodukční části jako vajíčka, embrya, semena, spory, jednotlivé buňky nebo protoplasty (Kováč, 1995). Právě z tohoto důvodu je využití metod explantátových kultur rostlin laboratorní technikou ve šlechtění rostlin.

## 2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je využití biotechnologických metod (prašníkové kultury, kultury semeníků, gyneceí a laterárních pupenů) u tetraploidního apomiktického druhu ostružiníku dvojbarevného (*Rubus bifrons*). Úspěšnou kultivací a regenerací rostlinných explantátů z rostlin *Rubus bifrons* je získání kalusů s následnou organogenezí. Tato práce se také zaměřuje na výběr vhodných metod sterilizace rostlinného materiálu a složení kultivačních médií, které by vedly k regeneraci explantátu. Cíle diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

### 1. Studium dostupné odborné literatury:

- a) problematika evolučních mechanismů apomiktických rostlin
- b) biotechnologické metody u zástupců čeledi *Rosaceae* se zaměřením na rod *Rubus*

### 2. Experimentální část:

- a) založení prašníkových kultur, kultur semeníků/gyneceí a laterárních pupenů z rostlinného materiálu tetraploidního apomiktu *Rubus bifrons*

### 3. Zpracování získaných výsledků:

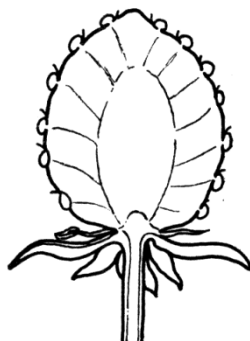
- a) zpracování dat a shrnutí výsledků vlastních experimentů
- b) průběžná fotodokumentace experimentů

## 3. Literární přehled

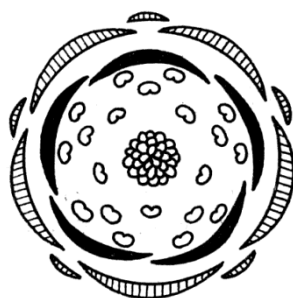
### 3.1. Čeleď růžovité (*Rosaceae*)

Růžovité (*Rosaceae*) jsou dvouděložné krytosemenné rostliny, zahrnující vytrvalé byliny až keře, zřídka letničky. Zástupci jsou rozšířeni na obou polokoulích, v tropických pásech se vyskytují jen na horách (Slavík, 1995). Tato čeleď je charakteristická určitými znaky, kterými se odlišuje od ostatních skupin:

Květy jsou oboupohlavné, vzácně jednopohlavné. Květenství této čeledi jsou hroznovitá, vrcholičnatá nebo se objevují také květy jednotlivé. Charakteristickým znakem je počet květních obalů [4-6(-8) četné] a častý srůst báze tyčinek v plochou až lahvicovitou, kuželovitou nebo číhovitou češuli (= hypanthium). Pestíky jsou však volné, počet tyčinek se pohybuje v rozmezí 1-30(-50), plodolisty většinou ve velkém počtu, ale také jen (3-)2(-1). Nejčastějšími plody této čeledi jsou nažky (oříšky), někdy uzavřené v zdřevnatělé češuli nebo zdužnatělé (šípek), také se můžeme setkat se souplodím nažek, např. - jahodník *Fragaria* sp. - obr. 1 nebo souplodím peckoviček např. ostružiník *Rubus* sp. (Slavík, 1995).



**Obrázek 1:** Souplodí nažek na zdužnatělém květním lůžku u jahodníku (převzato z Hadač, 1967)



**Obrázek 2:** Květní diagram jahodníku (*Fragaria* sp.) (převzato z Hadač, 1967)

Čeď rŕovité (*Rosaceae*) je pomŕně velká skupina angiospermních rostlin, zahrnující asi 3000 druhů ve 100 rodech, včeteě skupiny duŕnatých plodů, z nichŕ některé jsou pomŕně ŕiroce kultivované a mají značný hospodářský význam [např. jabloě (*Malus* sp.), aronie (*Aronia* sp.), hrušeě (*Pyrus* sp.), kdoule (*Cydonia* sp.) nebo mišpule (*Eriobotrya* sp.)] (Donoghue a kol., 2012). Tato čeď je lidskou populací hojně využívána, dřeviny jsou využívány na dřevo a také jako okrasné rostliny, plody jsou využívány ke konzumaci, např. malvice jabloní (*Malus domestica*), hrušní (*Pyrus communis*), peckovice třešní a višní (*Prunus avium*, *Prunus cerasus*), broskvoní (*Prunus persica*) nebo meruěk (*Prunus armeniaca*) (Navrátilová a kol., 2012) (Valíček, 2002).

Podle nové klasifikace, založené na studii molekulárních dat, je čeď rŕovitá (*Rosacea*) členěna na tři podčeďe: *Dryadoideae* (rod *Dryas* nebo rod *Cercocarpus*), *Rosoideae* (rod *Rosa*, *Rubus* nebo rod *Potentilla*) a *Spiraeoideae* (rody *Holodiscus*, *Sorbaria*) (Donoghue a kol., 2012).

## 3.2. Charakteristika rodu *Rubus*

Ostružiníky patří kvůli složitému rozmnožování k obtížně taxonomicky určitelnému rodu. Základní taxonomické zařazení rodu *Rubus* (Cronquist, 1988).

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** dvouděložné rostliny (*Magnoliopsida*)

**Podtřída:** *Rosidae*

**Řád:** růžotvaré (*Rosales*)

**Čeleď:** růžovité (*Rosaceae*)

**Rod:** ostružiník (*Rubus*)

Rod ostružiník (*Rubus*) je velmi rozsáhlý rod s 1000 - 1200 druhy, přičemž 300 - 400 z nich jsou sexuální a ostatní se rozmnožují apomikticky. Je rozšířený po celém světě kromě Antarktidy, v tropickém pásmu se vyskytuje pouze na horách (Slavík, 1995). V České republice roste podle současných znalostí nejméně 110 domácích a přes 10 druhů zavlečených nebo pěstovaných. Rod *Rubus* se rozpadá do dalších 12 - 13 dobře vyhraněných poddruhů, rozdíly mezi těmito poddruhy jsou především ve vegetativních orgánech (Trávníček a kol., 2000). V České republice rozlišujeme zástupce čtyř poddruhů (obr. 3): *Chamaerubus* (*Rubus chamaerubus* L. – ostružiník moruška), *Cylactis* (*Rubus saxatilis* L. - ostružiník skalní), *Idaeobatus* (*Rubus ileus* L. - ostružiník maliník) a *Rubus* (ostatní domácí druhy). Podrod *Rubus* se dále dělí na sekce *Rubus*, *Corylifolii* a *Caesii*, přičemž druhy ze sekcí *Rubus* a *Corylifolii* jsou často uváděny pod souhrnným jménem *Rubus fruticosus* agg. (Koblížek a kol., 2009).

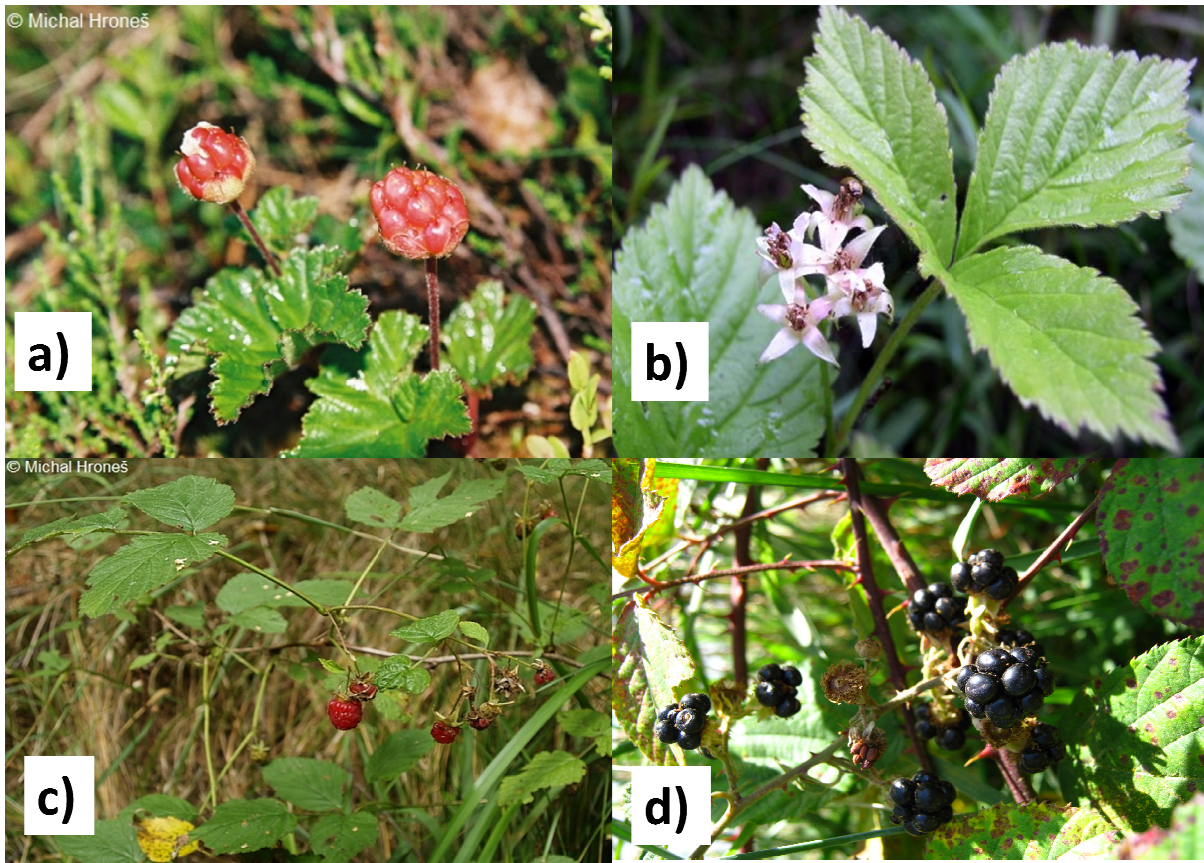
Ostružiníky jsou krátkověké keře, zpravidla s dvouletým životním cyklem, přičemž prvním rokem vyrostou dřevnatější nekvetoucí prýt a druhým rokem vyrůstají v paždí loňských listů větve zakončené květenstvím. Tímto se cyklus uzavírá a prýt na konci roku odumírá. Méně často se objevují jako vytrvalé byliny s podzemními výhony (Koblížek a kol., 2009). Stonky těchto keřů vykazují různorodé charakteristické znaky. Stonky mohou být vzpřímené nebo poléhavé, obvykle ostnitě, hranaté nebo oblé, se stranami plochými, vyklenutými nebo žlábkovanými, lysé nebo v různé míře chlupaté, nezláznaté nebo s přisedlými či stopkatými

žlázkami. Plodem jsou převážně peckovičky, volně spojené v polokulovité, kulovité, vejcovité až válcovité souplodí (plody ostružina a malina), s peckovičkami za zralosti navzájem pevně souvisejícími. Peckovičky jsou jednosemenné, obvykle šťavnaté, černé, červené nebo žluté, vnitřní oplodí je hladké nebo svraskalé (Slavík, 1995).

Název ostružiník (*Rubus* sp.) pochází z latinského slova *ruber*, což znamená červený, právě podle barvy plodů (Šmíd, 2002). Věda studující ostružiníky se nazývá batologie, název je odvozen z řeckého slova *batos*, což znamená ostružinový keř, ostružiník (Trávníček a kol., 2000). Využití ostružiníků je nepřeberné. Lidskou populací jsou převážně vysazovány jako okrasné rostliny, které se často sází k pergolám, plotům nebo na zakrytí míst, jakožto popínavá rostlina. Převážně jsou však ostružiníky využívány pro chutné a jedlé plody a proto se pěstují v řadě kultivarů (Horáček, 2007). Tyto šťavnaté plody se dále zpracovávají na šťávy, sirupy, ovocná vína, likéry, marmelády, džemy i kompoty. Mladé listy obsahují mnoho tříslovin (až 10 % gallotaninů), organické kyseliny, vitamín C atd., a proto jsou používány jako čajovina. Listy pro tento účel však vyžadují fermentační zpracování (Slavík, 1995).

Ostružiníky jsou v kultuře nejkratší dobu ze všech druhů drobného ovoce. Byly zavedeny z planě rostoucích rostlin asi kolem poloviny minulého století. V Anglii již okolo roku 1850 Thompson popsal 10 typů, vhodných pro pěstování (některé z nich byly amerického původu). Dnes pěstované odrůdy jsou kříženci různých druhů, poddruhů a variet a mnohdy je velmi obtížné přesně stanovit jejich botanický původ (Blatný, 1971).





**Obrázek 3:** Zástupci čtyř poddruhů, rostoucí v České republice:

a) *Rubus chamaerubus* L. (převzato z <http://www.naturabohemica.cz/rubus-chamaemorus/>)

b) *Rubus saxatilis* L. (převzato z <http://botany.cz/cs/rubus-saxatilis/>)

c) *Rubus idaeus* L. (převzato z <http://www.naturabohemica.cz/rubus-idaeus/>)

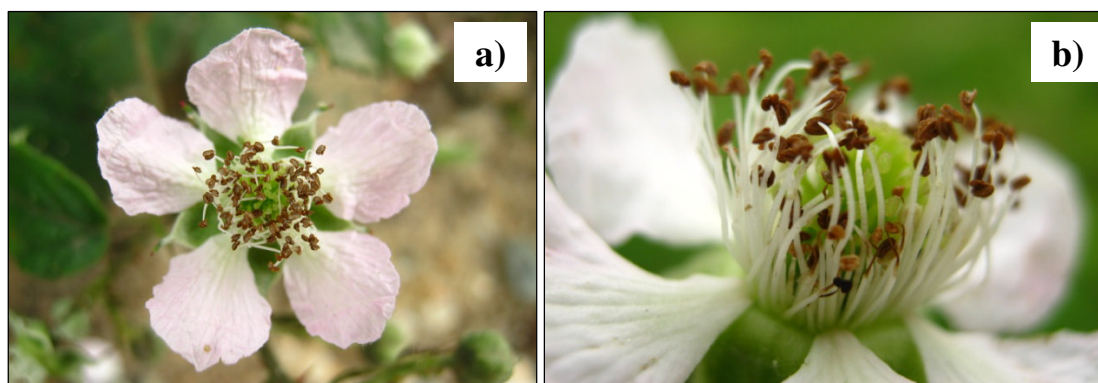
d) *Rubus bifrons* (Lenka Richterová)

### 3.2.1. Ostružiník dvojbarevný (*Rubus bifrons*)

V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili pouze na ostružiník dvojbarevný (*Rubus bifrons* VEST). Tento druh reprezentuje poměrně snadno rozeznatelné a zřetelně tetraploidní druhy série *Discolores*. *Rubus bifrons* je lokálně rozptýlen v teplejších oblastech (vzácně nebo zcela chybí v severních a zejména v severozápadních částech České republiky (Trávníček a Zázvorka, 2005). Celkové rozšíření ostružiníku dvojbarevného je území střední Evropy, na sever zasahuje do středního Německa a středního Polska, na západ se rozprostírá do Belgie a Nizozemí, na východě ho můžeme najít na Slovensku až Maďarsku a na jihu zasahuje do Francie, Švýcarska, Rakouska a Chorvatska (Slavík, 1995).

Lze jej nalézt na lesních okrajích a světlinách, pasekách, na zarůstajících mezích a úvozů cest, v lomech. Roste na půdách hlinitých i kamenitých, čerstvě vlhkých až dočasně vysychavých, také na půdách mírně kyselých až slabě alkalických. Obecně ho můžeme vidět ve výškách od 200 do 600 (-700) m. n. m. (Slavík, 1995).

Ostružiník dvojbarevný je většinou neopadavý keř se silnými prýty, které jsou červenohnědé barvy, tupě hranaté a neojíněné. Znakem jsou také silné ostny, dlouhé a šídlovité. Složené, pětičetné listy vykazují následující poznávací prvky: listy tuhé, rub bělostný, žilky dlouze chlupaté, terminální kvítek okrouhle obvejčitý až okrouhlý. Kvetoucí keře mají květy v prodloužených, hustých a listnatých latách (hroznech), korunní lístky mají bledě růžovou až červenou barvu, tyčinky jsou delší než čnělky (obr.4) (Horáček, 2007). Hlavní diagnostickými znaky tohoto druhu jsou však následující: prýty jsou voskově ojíněné (tlakem lze vosk z prýtu vytlačit), našedlé a s drobnými hvězdovitými chlupy. Okraj čepele lístků je ze zubů velmi špičatých a do různých stran směřujících. Čnělky jsou žlutavé (Slavík, 1995).



**Obrázek 4:** *Rubus bifrons* a) květ b) detail květu

### 3.3. Taxonomická klasifikace ostružiníků

V rámci evropské květeny je *Rubus* subgen. *Rubus* jednou z nejvíce taxonomicky komplikovaných skupin. Ve střední Evropě zástupci této skupiny tvoří komplex, zahrnující několik sexuálních druhů a také polyploidní apomiktické druhy. Nové morfotypy se vyvíjejí pomocí nahodilé hybridizace s následným rozštěpením a mohou se stabilizovat pomocí obnovení apomixie (Trávníček a kol., 2005). Pokud se za vhodných podmínek tyto stabilizované typy více rozšíří, mohou být chápány jako nové samostatné druhy. Problémem dřívější klasifikace byl fakt, že prakticky všechny apomiktické ostružiníky jsou ve svém základu kříženci, a tedy vymezení základních druhů bylo velmi subjektivní, navíc rozpoznat skutečné rodičovské typy daného druhu či hybrida je obvykle téměř nemožné (Trávníček, a kol., 2000).

Z přibližně 750 druhů, které jsou v Evropě rozeznány, jsou pouze 3 diploidní sexuální druhy a další druhy ostružiníků se řadí k polyploidním druhům. Výjimkou z tetraploidních taxonů ostružiníků je *Rubus* ser. *Glandulosi*, který je znám pro svou převládající sexuální reprodukci. Tento taxon se velmi často kříží s tetraploidními členy *Rubus* ser. *Discolores* a tím dochází ke vzniku mnoha hybridogenních populací (Šarhanová a kol., 2012). Tito kříženci poté vyštěpují v dalším potomstvu morfologicky odchylné typy. V důsledku toho vykazuje rod *Rubus* obrovskou různorodost forem a zároveň i velkou variabilitu uvnitř jednotlivých taxonů (Holub, 1995).

Ostružiníky také velmi citlivě reagují na podmínky prostředí, hlavně na světelný režim stanoviště, a jejich morfologie a znakové vybavení jsou těmito okolnostmi tak podstatně ovlivněny, že je obtížné jedince tohoto typu správně určit (Holub, 1995). Šarhanová a kol. (2012) také zjistili, že *Rubus bifrons*, který se rozmnožuje převážně apomikticky, má schopnost podstoupit reprodukční režim, jakožto reakci na podmínky prostředí.

Jedním z mnoha důvodů, který vedl (a vede) k problémům v taxonomii ostružiníků, byla snaha zařadit každou rostlinu, každou položku k nějakému taxonu. Snaha určit každou položku v této skupině neodpovídá jejím vývojovým poměrům (Holub, 1995). Také proto se v současné klasifikaci ostružiníků dodržuje pravidlo, že za druh je považován pouze ten stabilizovaný apomiktický genotyp, který má areál výskytu alespoň v jednom směru širší než (20) 50 km (Trávníček a kol., 2000).

### 3.4. Apomixie

Reprodukce je klíčovým prvkem života na Zemi. Jedním z přínosů sexuálního rozmnožování je tvorba genetické variability. Rekombinace mezi genotypy dovoluje rychlé adaptace na ekologické a klimatické změny, únik před parazitismem nebo škodlivými mutacemi. Dvojité oplození, jakožto evoluční novinka u kvetoucích rostlin, poskytuje výživu pro vyvíjející se embryo a tak zvyšuje úspěšné šíření semen. Jak uvádí Šarhanová a kol. (2012), ve 223 rodech, z celkového množství přibližně 14 000 rodů, je sexuální reprodukce nahrazena apomixií, klonálním rozmnožováním pomocí semen. Při tomto typu rozmnožování nedochází k oplození a zcela nebo částečně vymizel pohlavní proces. V dnešní době rozlišujeme dva typy tohoto reprodukčního systému a tím je vegetativní apomixie a agamospermie.

Vegetativní apomixie se vyskytuje u rostlin, které postrádají schopnost sexuální reprodukce, a tudíž se rozmnožují pouze vegetativně (Briggs a Walters, 2001). Vegetativní rozmnožování je umožněno tím, že rostlinné buňky jsou totipotentní, což znamená, že z každé rostlinné buňky může potencionálně vzniknout nový jedinec. Tento typ reprodukce se děje různými fragmenty rostlinných orgánů, např. oddenky, šlahouny, stonkovými, listovými, kořenovými, oddenkovými řízkami, cibulemi. Potomek vzniklý vegetativním rozmnožováním se nazývá klon a má shodný genotyp s mateřskou rostlinou (Vinter, 2012). Příkladem rostliny rozmnožující se vegetativně může být například vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*), který se šíří rozrůstáním a fragmentací částí prýtlů. Vegetativní apomixie umožňuje rostlině reprodukovat velké množství dobře adaptovaných rostlin stejného genotypu, přičemž nedochází k žádným nebo minimálním ztrátám. Je možné, že vegetativní rozmnožování je limitováno stárnutím a chorobami. Pozorování pěstovaných rostlin rodu *Citrus* naznačuje, že opakované vegetativní množení skutečně navozuje stárnutí. Vegetativní rozmnožování také přináší riziko, že se v rostlině může rozvinout virové nebo jiné choroby (Briggs a Walters, 2001).

Na druhé straně apomixii neboli agamospermii, lze charakterizovat jako rozmnožování pomocí semen bez oplození vaječné buňky. Apomixie byla pozorována převážně u čeledě *Rosaceae*, *Poaceae* a *Asteraceae*, kdy první dvě čeledě jsou charakterizovány pseudogamií (dochází k oplození buňky centrálního vaku) a pro čeleď *Asteraceae* je typické autonomní vyvíjející endospermu (Šarhanová a kol., 2012). Úplnou agamospermii není obtížné odhalit. Například u většiny jedinců pampelišky lékařské (*Taraxacum officinale*) získáme životaschopné nažky i po emaskulaci květů následované zabalením úboru (Briggs a Walters,

2001).

Zvláštním případem apomixie je tzv. pseudogamie (pro ostružiníky typický způsob rozmnožování), při které se sice zárodek vyvíjí bez oplození, avšak endosperm vzniká pohlavní cestou a pro jeho vývoj je proto nutné opylení (Trávníček a kol., 2000). Odhalení pseudogamie je velice obtížné, obvykle nás na ni upozorní dědičnost po mateřské linii. V poslední době lze apomixii efektivně studovat díky molekulárním markerům. Jestliže zkřížíme dvě rostliny s různými genetickými markery, můžeme poté testovat hypotézu, zda jejich potomstvo zdědilo mateřský genotyp (Briggs a Walters, 2001).

Jsou rozlišovány dva základní typy apomixie: sporofytická apomixie a gametofytická apomixie. Při sporofytické apomixii vznikají embrya přímo ze somatické buňky nucelu (Šarhanová a kol., 2012).

Gametofytická apomixie je charakteristická tím, že se samčí gametofyt vyvíjí bez meiotické redukce a embryo vzniká z neoplozeného vajíčka nebo také z jiné buňky- např. synergidy. Tento typ apomixie se vyskytuje u mnoha rodů kvetoucích rostlin a to prostřednictvím dvou způsobů, klasifikované jako aposporie a diplosporie (Talent, 2009). Tyto dva typy gametocytické apomixie rozlišujeme podle toho, z které buňky vzniká neredukovaný zárodečný vak (Šarhanová a kol., 2012). Aposporie se vyznačuje tím, že megagametofyt vzniká z neredukované buňky nucela (Talent, 2009). Naopak při diplosporii vzniká neredukovaný zárodečný vak z megasporu mateřské buňky. Pro gametofytickou apomixii jsou nutné a potřebné tři nezávislé kroky: 1. tvorba neredukovaného zárodečného vaku, 2. partenogenetický vývoj neredukované vaječné buňky a 3. autonomní vývoj endospermu (Šarhanová a kol., 2012).

Apomixie tedy může být jak fakultativní (částečná), nebo obligátní (úplná). Jsou známy rody, u nichž apomixie zcela nahradila sexuální produkci, například u rodu kontryhel (*Alchemilla* sp.) mají rostliny hojného severoevropského druhu defektní pyl, který často degeneruje ve stádiu tetrády, a předčasně dozrávají plody. To naznačuje, že opylení není podmínkou tvorby semen, ale jedná se o obligátní apomixii (Briggs a Walters, 2001). Naopak fakultativní apomixie kombinuje dva způsoby semenného rozmnožování- pohlavní, kombinující u potomstva znaky obou rodičů a nepohlavní, zachovávající v potomstvu genotyp mateřské rostliny (Trávníček a kol., 2000).

Apomixie, stejně jako ostatní způsoby rozmnožování, má své výhody i nevýhody. Produkce semen apomiktickou cestou poskytuje rostlině rozšiřování semen na velké vzdálenosti a možnost přežití nepříznivých podmínek. Apomixie je také prostředek k udržování vysoké heterozygotnosti. Nevýhodami jsou mutace, vzniklé v různých liniích,

kteří se v organismu hromadí a také neschopnost reagovat na měnící se změny prostředí (Briggs a Walters, 2001).

### 3.5. Biotechnologické metody u rostlin

Technika explantátových kultur rostlin je založena na předpokladu, že z rostlin mohou být odděleny jejich jednotlivé části- např. pletiva, buňky nebo orgány, s kterými se následně pracuje v *in vitro* podmínkách, aby bylo možné získat zpět kompletní rostlinu (Trigiano a Gray, 2005). Techniky explantátových kultur se v dnešní době uplatňují jako důležité experimentální metody v rámci výzkumu rostlinné fyziologie i genetiky a staly se zároveň základem rostlinných biotechnologií (Luštinec a Žárský, 2005).

Jak už bylo zmíněno výše, tyto metody jsou založeny na izolaci částí rostlin. Jako materiál pro kultivaci *in vitro* je možné teoreticky použít jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem- vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, reprodukční části- vajíčka, embrya, semena, spory nebo jen jednotlivé buňky nebo protoplasty (Kováč, 1995). Takto odebrané a povrchově sterilizované části rostlin se poté musí ošetřit vhodnými roztoky, aby se zamezilo nechtěné bakteriální infekci. V aseptickém prostředí se jednotlivé části rostlin převádí na vhodná kultivační média, obohacená o rostlinné hormony a vitamíny. Po určité době kultivace v kultivační místnosti jsou vzniklé rostliny částečně připraveny na převod z podmínek *in vitro* do podmínek *in vivo*, do vybraného substrátu (Novák, 1990). Vhodným substrátem můžou být například rašelinové jiffy (sadbové rašelinové válečky) nebo také expandovaný perlit, což je lehká, zrnitá, pórovitá hmota bílé nebo šedobílé barvy vyráběna tepelným zpracováním ze surového perlitu. Perlit provzdušňuje pěstební substráty, stabilizuje vlhkost v půdě, zlepšuje využívání hnojiv a přispívá k dobré kondici pěstovaných rostlin. Používá se k vysévání osiv náchylných na plísně, k hydroponickému pěstování, ale i k ochraně rostlin před mrazem ([www.perlit.cz](http://www.perlit.cz)).

Využití explantátových kultur rostlin je v dnešní době v podstatě neomezené. Co se týče dřevin, explantáty představují vhodný materiál k jejich rozmnožování (mikropropagaci) nebo ozdravování, k uchování genofondu domácích dřevin, výzkumu genetické proměnlivosti (polyploidie, haploidie) nebo k selekci významných znaků, jako jsou například odolnost vůči chorobám, mrazu nebo pesticidům (Kamenická a Rypák, 1989). Mezi další klady využití rostlinných explantátů lze jmenovat kultivaci izolovaných meristémů, jakožto metodu ozdravování rostlin od virových infekcí, překonávání fyziologických bariér při hybridizaci

taxonomicky vzdálených druhů pomocí kultivace izolovaných embryí, řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů nebo produkce haploidů při kultivaci prašníků, mikrospor nebo vajíček (Hradilík, 2005).

### **3.5.1. Techniky explantátových kultur u čeledi *Rosaceae***

Čeleď *Rosaceae* zahrnuje vytrvalé byliny a keře (3000 druhů ve 100 rodech). Mezi často využívané rody pro techniky explantátových kultur patří například rod *Malus* sp.. Dobránszki a kol. (2010) při mikropropagaci jabloně využili jednotlivých částí rostliny (laterární pupeny, apikální pupeny) a zároveň došli k závěru, že úspěšná mikropropagace je ovlivněna vnitřními a vnějšími faktory, jako jsou například genotyp rostliny, fyziologický stav, složení médií nebo množství světla. *In vitro* mikropropagace hraje také velice důležitou roli při množení růží (*Rosa* sp.). Využití nodálních segmentů nebo vrcholových pupenů lze docílit rychlého namnožení odrůd s požadovanými vlastnostmi bez chorob (Pati a kol., 2006). Kultivovat lze také celé listy rostlin. Gupta a Mahalaxmi (2009) dosáhli vysoké frekvence regenerace (bez tvorby kalusů) z celých listů ostružiníku (hybridní kultivar Black Satin). Díky experimentům zjistili, že věk donorové rostliny velice významně ovlivňuje potenciál regenerace explantátů. Naopak somatické embryogeneze lze docílit například kultivací nezralých kotyledonů (tzn. děloh, děložních listů). Z otevřených, opylených, nezralých plodů tří druhů višňi byly izolovány jednotlivé kotyledony, které byly následně přeneseny na médium, kde došlo k regeneraci ve formě somatické embryogeneze (Tang a kol., 2000). Postup regenerace rostlin z nezralých semen *Rosa rugosa* Thunb. popsali rovněž Kunitake a kol. (1993). Z nezralých semen, 2-3 týdny po odkvětu, získali kultivací na MS médiu (Murashige a Skoog, 1962) embryogenní kalusy, které dále úspěšně regenerovaly v dospělé rostlinky.

### **3.5.2. Prašníkové kultury rostlin**

Kultivací prašníků získáme haploidní rostliny v mnohonásobně vyšší frekvenci, než pomocí jiných experimentálních metod (Vyskot a Novák, 1973). Převrat v možnosti získávat haploidy ve velkém množství nastal již v roce 1967. Už tehdy Nitschova skupina ve Francii

dokázala u série druhů rodu *Nicotiana*, že kulturou prašníků *in vitro* na relativně jednoduchých kultivačních půdách lze skutečně získávat haploidní rostliny (Landa a Kocourek, 1973). V dnešní době existují dvě základní metody odvozování haploidních rostlin z prašnickových kultur- první je pořadí prašník – haploidní rostlina, druhý případ je pořadí prašník – haploidní kalus – haploidní rostlina (Landa a Kocourek, 1973).

Pro tuto biotechnologickou metodu nastal obrovský skok před 40 lety, kdy Guha a Maheshwari (1964) zjistili, že haploidní rostliny lze získat z relativně velkého množství nezralých prašníků *durmanu* neškodného (*Datura innoxia* Mill.). Později J. P. Nitsch a jeho spolupracovníci rozpracovali metodu kultivace prašníků *in vitro* a odhalili základní principy pylové embryogeneze (Novák, 1990). Od té doby se metoda kultivace prašníků začala používat převážně na tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), který se časem stal modelem speciálně pro prašnickové kultury (Trigiano a Gray, 2005). Kultivace prašníků *in vitro* byla popsána v rámci čeledi *Salicaceae* (Richterová, 2011). Androgeneze se využívá u celé řady druhů, zejména z čeledi *Solanaceae*. Uplatnění haploidů je zejména ve šlechtění obilovin nebo brambor (Novák, 1990).

Nejčastější metodou androgeneze *in vitro* je kultivace nepoškozených prašníků, jako poměrně jednoduchý a rychlý způsob k namnožení rostlin. Právě proto jsou prašnickové kultury využívány k produkci homozygotních linií rostlin (Hall, 1999). Nejčastěji se ke kultivaci používají celé prašníky sterilně vypreparované z pupat ve vhodném vývojovém stádiu. Následná frekvence androgeneze je vyšší v prašnicích odebíraných na počátku kvetení a klesá se stářím donorové rostliny. Kultivace celých prašníků má však i své nevýhody, např. možnost vzniku rostlin nejen z vlastních mikrospor, ale i ze somatických pletiv prašníků, což má za následek produkci rostlin různého stupně ploidie (Novák, 1990).

Alternativou ke kultivaci celých prašníků mohou být mikrosporové kultury, které jsou mechanicky izolovány a kultivovány nezávisle na prašnicích (Hall, 1999). Mikrospory kultivované *in vitro* se mohou vyvíjet v zásadě dvěma způsoby: 1. přímá androgeneze- haploidní rostliny vznikají procesem pylové embryogeneze, 2. nepřímá androgeneze- pylové buňky se opakovaně dělí a vytvářejí nediferencovaný kalus (Novák, 1990).



### 3.5.2.1. Prašníkové kultury čeledi růžovitých (*Rosaceae*)

Výzkum prašníkových kultur u ovoce a bobulovin byl popsán v řadě prací. Jimi vyvinuté metody, vedoucí k produkci haploidních regenerovaných nových kultivarů, však nejsou účinné na jiné genotypy rostlin, a proto jsou pokusy v tomto směru stále potřebné. Savel'ev a kol. (2010) ve své práci s prašníkovými kulturami především z rostlin jabloní, hrušní, jahodníků a ostružiníků zjistili, že závislost kalogenní aktivity (kalogeneze) prašníků má blízký vztah k mateřské rostlině. Peixe a kol. (2004) se zabývali indukci haploidních rostlin z prašníků meruňky obecné (*Prunus armeniaca*). Jejich výsledkem bylo získání kalusů. Pokud však dojde ke vzniku kalusu, může nastat problém, zda regenerace proběhla ze samotných pylových zrn, nebo ze somatických pletiv prašníků. Harn a Kim (1972) získali haploidní rostliny meruněk z prašníkových kultur, avšak ploidie rostlin nebyla předložena (Peixe a kol., 2004). Dihaploidní rostliny rodu *Malus* sp. a tudíž homozygotický materiál naopak získali pomocí androgeneze Höfer a kol. (1999).

Metoda kultivace prašníků nebo semeníků u rodu ostružiník (*Rubus* sp.) není ještě podrobně studována a běžně používána. Při výzkumech ostružiníků je využívána kultivace meristémů nebo dormantních pupenů, ze kterých lze získat adventivní výhonky a poté celou rostlinu (Gajdošová a kol., 2006). Úspěšně lze regenerovat rostliny ostružiníků také z axilárních pupenů (Wei a kol., 1992).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Rostlinný materiál

K experimentům byl použit rostlinný materiál z ostružiníku dvojbarevného (*Rubus bifrons*). Tento druh roste běžně v přírodě České republiky, pro odběr explantátů byly však využity pouze rostliny pěstované na pozemcích katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (obr. 5 A, B)



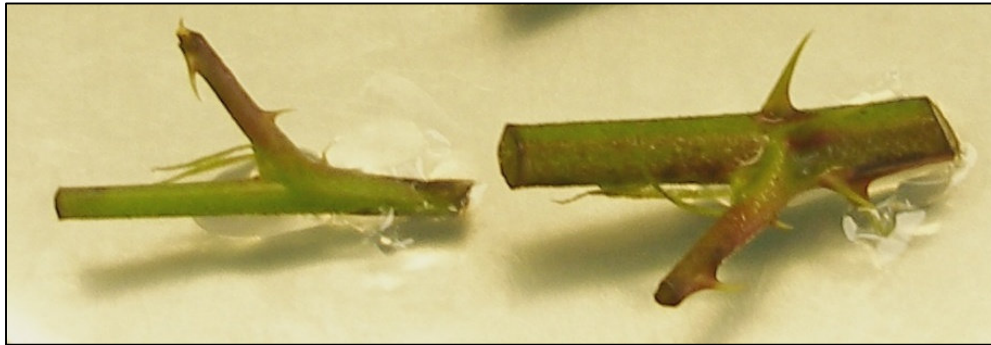
**Obrázek 5 A, B:** Pozemek katedry botaniky PŘF UP Olomouc v Holici s rostlinami *Rubus bifrons* (Lenka Richterová, 2012)

#### 4. 1. 1. Odběr pupat a laterálních pupenů

Sběr pupat probíhal průběžně během měsíce června a července roku 2012 podle harmonogramu (příloha 7). Rostliny ostružiníku dvojbarevného byly vysazeny na pozemku o rozloze 8m x 16m. Každá mateřská rostlina byla očíslována, popsána a připevněna bambusovými tyčemi, aby lépe odolávala výkyvům počasí (příloha 1, obr. C). Při sběru a také průběžně během celé vegetační doby ostružiníků byly pořizovány fotografické záznamy, pro lepší přehlednost a dokumentaci mateřských rostlin (příloha 1, obr. A, B, D, E, F).

Odběr laterálních pupenů probíhal ke konci měsíce června 2012 (příloha 7) z mateřských rostlin *Rubus bifrons* (příloha 2, obr. F). Odebrané části stonků byly následně

v laboratoři zkráceny na menší kusy s laterálními pupeny, které byly využity ke sterilizaci a následně ke kultivaci (obr. 6).



**Obrázek 6:** Laterální pupeny *Rubus bifrons* (foto: Božena Navrátilová)

## 4. 2. Experimenty

Pro kultivaci prašníků, semeníků a celých apokarpických gynecí byla odebírána neotevřená poupata, z důvodu nezralosti prašníků a v nich obsažených pylových zrn. Mateřské rostliny obsahovaly poupata různých velikostí, ze kterých byly vypreparovány vzorky prašníků ke zjištění vývojového stádia pylových zrn (obr. 7). Nejmenší poupata měřila do 3 mm a největší dosahovala 8 mm (příloha 2, obr. B, C). Po otevření pod mikroskopem obsahovala jednotlivá poupata tyčinky, které ještě nepřesahovaly čnělku (příloha 2, obr. D). Pro naše experimenty bylo důležité, aby poměr korunních lístků k délce prašníků byl  $P/A < 1$ .



**Obrázek 7:** Poupata z donorových rostlin *Rubus bifrons*

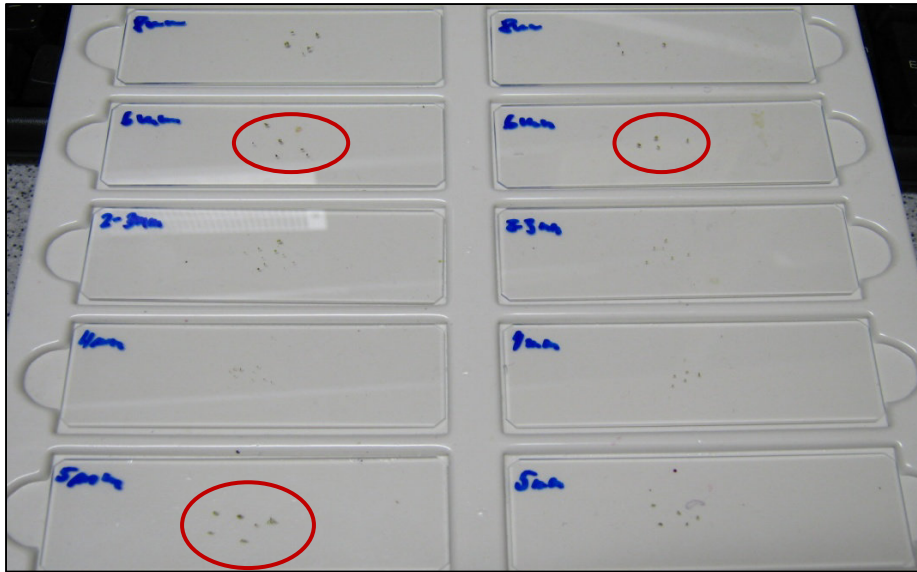
### 4.2.1. Vývojové stádium pylových zrn

Pro kultivaci *in vitro* bylo důležité izolovat z poupat prašníky ve vývojovém stádiu 1- jaderných mikrospor. Poté je možné stanovit délku (velikost) poupat, která je v korelaci s odpovídajícím vývojovým stádiem mikrospor a taková poupata byla použita pro izolaci prašníků. Pro stanovení vývojového stádia pylových zrn není nutné izolovat prašníky v aseptickém prostředí. Postup:

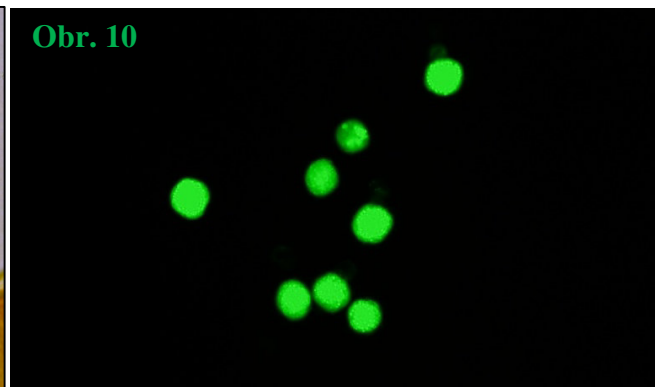
- odebereme poupata o velikosti 2,5 – 8 mm
- z jednotlivých poupat izolujeme prašníky pod binokulární lupou
- rozdrčené prašníky a uvolněná pylová zrna přeneseme preparační jehlou na podložní skla (obr. 8) a přidáme kapku média NLN
- následně na každé podložní sklo přikápneme acetokarmín, necháme 2 minuty působit

Složení acetokarmínu: 1,5 g karmínu (SERVA) přidáme do 100 ml 45% kyseliny octové a zvolna vaříme v Erlenmayerové baňce jednu hodinu. Po vychladnutí přefiltrujeme. K jedné polovině připraveného acetokarmínu přidáme několik kapek nasyceného roztoku chloridu železitého ve 45 % kyselině octové až je barvivo modravě-červené a pak přidáme zbytek neupraveného acetokarmínu.

- vzorky přikryjeme krycím sklem
- pod optickým mikroskopem (Olympus BX60) pozorujeme při zvětšení 400x – 600x vývojová stádia pylových zrn- převážně jednojaderné mikrospory, kulovitého tvaru (obr. 9)



**Obrázek 8:** Rozdrcené prašníky a uvolněná pylová zrna *Rubus bifrons* na podložních sklech



**Obrázek 9:** Pylové zrno z poupat *Rubus bifrons* o velikosti 6 mm barvené acetokarmínem (zvětšení 400x)

**Obrázek 10:** Pylová zrna ve stádiu 1- jaderné mikrospory ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 (zvětšení 10x10)

#### 4.2.2. Stanovení životaschopnosti pylových zrn

Před izolací prašníků byla stanovována životnost pylových zrn. K tomuto účelu byla využita fluorescenční metoda s použitím fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60 (hranol WB, excitace 495 nm). Postup:

- na podložní sklíčko s rozdrčenými prašníky a uvolněnými pylovými zrny přidáme 50-100  $\mu$ l pracovního roztoku FDA (fluorescein diacetát)
- necháme 1 minutu a přikryjeme krycím sklem

Složení zásobního roztoku: 5 mg fluorescein diacetátu rozpustíme v 1 ml acetonu, uchovááme při - 20 °C v dobře uzavřené lahvičce

Složení pracovního roztoku: 20  $\mu$ l zásobního roztoku přidáme do 1 ml NLN média

- FDA proniká do živých buněk, které pak pod mikroskopem vykazují zelenou fluorescenci (obr. 10)
- životnost pylových zrn byla testována u pupat o velikosti 4 mm, 5 mm a 6 mm
- životnost byla stanovena jako procentuální podíl sumy živých (svítících) pylových zrn k sumě všech pylových zrn dle vzorce:

$$\text{životnost (\%)} = \frac{\sum \text{živých pylových zrn}}{\sum \text{všech pylových zrn}} * 100$$

#### 4.3. Sterilizace rostlinného materiálu

Byla sterilizována poupata *Rubus bifrons* a laterální pupeny *Rubus bifrons*.

### 4.3.1. Sterilizace poupat *Rubus bifrons*

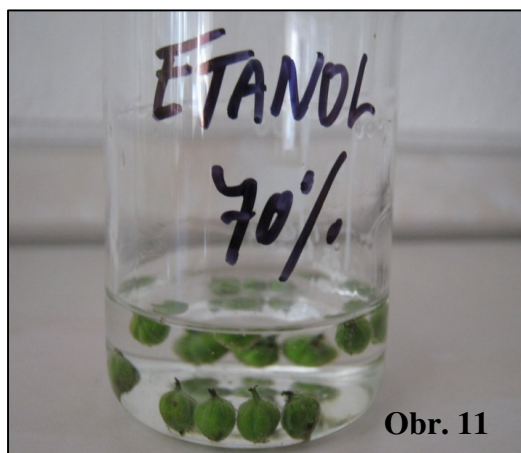
Pro naše experimenty byla sterilizována poupata s prašníky podle stanoveného vývojového stádia (jednojaderné mikrospory). Odebraná poupata z mateřské rostliny byla ošetřena sterilizací pomocí dvou různých dezinfekčních činidel v následujících postupných krocích:

#### **První postup povrchové sterilizace poupat (obr. 11):**

- poupata byla umístěna do kádinky
- do kádinky s poupaty byl přidán 70% etanol po dobu 1,5 minuty
- v již aseptickém prostředí byla poupata opláchnuta 3x sterilní destilovanou vodou

#### **Druhý postup povrchové sterilizace poupat (obr. 12):**

- poupata byla umístěna do kádinky
- do kádinky s poupaty byl přidán 2,5% chloramin B po dobu 1 minuty
- v již aseptickém prostředí byla poupata opláchnuta 3x sterilní destilovanou vodou



**Obrázek 11:** Ošetření poupat v 70% etanolu

**Obrázek 12:** Ošetření poupat v 2,5% chloraminu B

### 4.3.2. Sterilizace laterálních pupenů *Rubus bifrons*

Při sterilizaci laterálních pupenů byl použit odlišný způsob sterilizace a to z důvodu větší pravděpodobnosti kontaminace materiálu. Explantáty byly sterilizovány pomocí dvou dezinfekčních činidel. Postup:

- připravené segmenty *Rubus bifrons* vložíme do kádinky
- do kádinky přidáme 70% etanol, který necháme na rostlinný materiál působit 1 minutu
- po uplynutí doby etanol odstraníme
- poté segmenty desinfikujeme v kádince pomocí 2,5% chloraminu B po dobu 10 minut
- v již aseptickém prostředí segmenty propláchneme 3x sterilní destilovanou vodou
- segmenty umístíme na ½ MS médium v Petriho miskách (obr. 13)



**Obrázek 13:** Segmenty *Rubus bifrons* na ½ MS médiu (foto: Božena Navrátilová)

#### 4.4. Izolace prašníků, semeníků a gynecí

Izolace prašníků, semeníků a gynecí z povrchově desinfikovaných pupat o velikosti 5 – 6 mm byla provedena v již aseptickém prostředí flow- boxu.

##### Postup:

- na podložní sklíčko pod binokulární lupou (Olympus SZ51) umístíme poupě
- poupě přidržíme pinzetou a pomocí preparační jehly vylamujeme jednotlivé prašníky
- ze stejného poupěte odebíráme také jednotlivé semeníky, popř. celá gynecia
- jednotlivé prašníky, semeníky a gynecia poté přeneseme jehlou do Petriho misek na připravená kultivační média (vždy 20 prašníků, 20 semeníků a 4 gynecia na jednu Petriho misku o průměru 60 mm)



## 4.5. Kultivace rostlinného materiálu

Pro kultivaci prašníků, semeníků, gynecí a laterálních pupenů byla vybrána média na základě jejich složení, vhodné pro tyto metody explantátových kultur. Některá média byla doplněna o další sloučeniny, u nichž byl předpokládán pozitivní účinek na explantát (složení použitých kultivačních médií viz tabulka 1). Všechna média byla připravena standardními postupy a následně sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizačního procesu u médií byla 30 min. Ph médií bylo upraveno na 5,8.

### 4.5.1. Kultivace prašníků, semeníků a gynecí u *Rubus bifrons*

Pro kultivace bylo vybráno 8 variant kultivačních médií- A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2 (tabulka 1), lišící se složením a koncentracemi makro a mikro prvků, růstových regulátorů a dalších sloučenin, jako jsou například aminokyseliny prolin a glycin, které se přirozeně vyskytují v prašnicích jako osmoprotektanty. Média A2, B2, C2 a D2 jsou stejného složení jako média A1, B1, C1 a D1, ale s modifikacemi ve formě přidaných aminokyselin (prolin, glycin) a odlišné koncentrace sacharosy. Pro kalusy, získané z experimentů bylo připraveno médium F a pro případnou indukci organogeneze byly vybrány 2 varianty kultivačních médií (viz tabulka 2), lišící se koncentrací sacharosy a přidáním glycinu.

**Tabulka 1:** Složení médií pro kultivaci prašníků, semeníků a gynecí u *Rubus bifrons*

Označení média	Název média	Složení média	Reference
A1	Nitsch a Nitsch médium	0,1 mg/l 2, 4- D 0,1 mg/l zeatin 0,5 mg/l IAA 40 g/l sacharosa 8 g/l agar	<i>Peixe a kol. (2004)</i>
A2	Nitsch a Nitsch médium	0,1 mg/l 2, 4- D 0,1 mg/l zeatin 0,5 mg/l IAA 80 g/l sacharosa* 8 g/l agar	<i>Peixe a kol. (2004)</i>
B1	B5 médium	2 mg/l NAA 1 mg/l BA 100g/l sacharosa 8 g/l agar	<i>Keller a kol. (1975)</i>
B2	B5 médium	2 mg/l NAA 1 mg/l BA 100 g/l sacharosa 8 g/l agar 100 mg/l prolin** 40 mg/l glycin**	<i>Keller a kol. (1975)</i>
C1	B5 médium	2 mg/l 2, 4- D 1 mg/l kinetin 90 g/l sacharosa 8 g/l agar	<i>El-Hennawy a kol. (2011)</i>
C2	B5 médium	2 mg/l 2, 4- D 1 mg/l kinetin 90 g/l sacharosa 8 g/l agar 100 mg/l prolin** 40 mg/l glycin**	<i>El-Hennawy a kol. (2011)</i>

Označení média	Název média	Složení média	Reference
<b>D1</b>	MS médium	1 mg/l BA 0,5 mg/l 2, 4- D 0,1 mg/l kinetin 30 g/l sacharosa 8 g/l agar	<i>Song a kol. (2007)</i>
<b>D2</b>	MS médium	1 mg/l BA 0,5 mg/l 2, 4- D 0,1 mg/l kinetin 100 g/l sacharosa* 8 g/l agar	<i>Song a kol. (2007)</i>
<b>F</b>	MS médium	B5 vitamíny 0,5 mg/l BAP 0,1mg/l IBA 10 g/l sacharosa 8 g/l agar	<i>Peletier a kol. (1983)</i>

Pozn.: \* rozdílná koncentrace sacharosy oproti původnímu médiu

\*\* přidání aminokyselin do původního média

**Tabulka 2:**Složení médií pro indukci organogeneze z kalusu

<b>Médium 1.</b>	<b>MS médium</b> 1 mg/l BAP 0,5 mg/l NAA 30 g/l sacharosa 8 g/l agar
<b>Médium 2.</b>	<b>MS médium</b> 1 mg/l BAP 0,5 mg/l NAA 50 g/l sacharosa 40 mg/l glycin 8 g/l agar

#### **4.5.2. Kultivace laterálních pupenů *Rubus bifrons***

Desinfekčně ošetřené segmenty *Rubus bifrons* byly v aseptickém prostředí zkráceny na délku vhodnou ke kultivaci- 2,5 cm. Celkově bylo kultivováno 11 kusů segmentů s laterálními pupeny a to na médiu MS doplněném 0,01 mg/l IBA a 0,01 mg/l BAP. Kultivace laterálních pupenů probíhala v kultivační místnosti s denním režimem 16/8 h den/noc a teplotou  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 5. Výsledky

Byly odebírány a kultivovány prašníky, semeníky, gynecia a laterální pupeny z mateřských rostlin *Rubus bifrons*, rostoucí na pozemcích katedry botaniky Přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci. Při experimentech bylo hodnoceno: 1. postup sterilizace, 2. složení kultivačních médií, 3. kontaminace kultivovaných explantátů, 4. vhodnost explantátu pro biotechnologické metody.

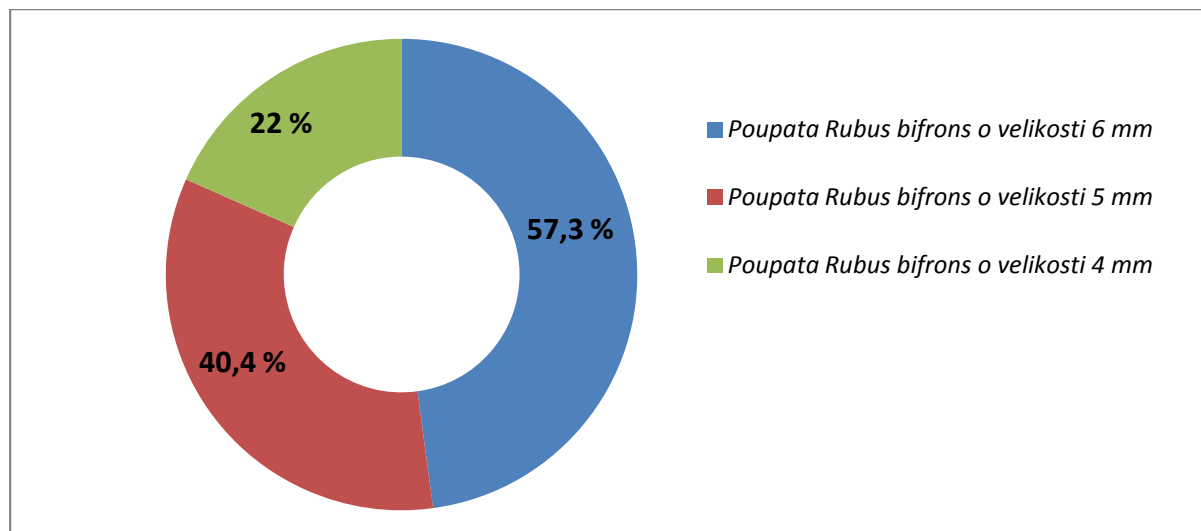
### 5.1. Stanovení vývojového stádia pylových zrn

Pro kultivaci prašníků bylo nutné izolovat prašníky z pupat ve vývojovém stádiu 1- jaderných mikrospor. Nejvhodnějšími pupaty pro naše experimenty se po barvení acetokarmínem jevíly pupata o velikosti 5-6 mm, ze kterých jsme následně odebírali prašníky ke kultivaci.

### 5.2. Stanovení životnosti pylových zrn

Pro dosažení nejlepších výsledků kultivace byla stanovena životnost pylových zrn. Životnost pylových zrn byla testována u pupat o velikosti 4 mm, 5 mm a 6 mm. Bylo pozorováno zvyšování životaschopnosti pylových zrn v závislosti na velikosti pupat. U pupat o velikosti 4 mm byla životaschopnost pouze 22 %, u pupat o velikosti 5 mm 40,4 % a nejlepších výsledků dosahovala životnost u pupat o velikosti 6 mm a to 57,3 %. Získané výsledky jsou znázorněny v grafu (obr. 14).

**Obrázek 14:** Životnost pylových zrn u *Rubus bifrons*



### 5.3. Sterilizace poupat *Rubus bifrons*

Před izolací a kultivací prašníků, semeníků a gyneceí byla poupata povrchově sterilizována, tj. ošetřena vhodnými dezinfekčními prostředky. Jelikož jsou prašníky uzavřeny v poupěti, zmírňuje se tímto jejich kontakt s okolím, díky čemuž nebylo nutné využívat zvláštních postupů a prostředků. Po zkušenostech s experimenty v bakalářské práci byly vybrány dva sterilizační postupy. První postup bylo ošetření 70% etanolem, druhý postup zahrnoval ošetření 2,5% chloraminem B. Během kontroly a vyhodnocování výsledků (hodnocení probíhalo 3x v období červenec – září 2012) byla kontaminovaná média odstraněna a explantáty byly přepasážovány na nové, stejné médium. Oba použité postupy a roztoky byly vhodné pro sterilizaci poupat u *Rubus bifrons*. Během celé doby kultivace nedocházelo ke kontaminaci explantátů, pocházející z rostlinného materiálu.

## 5.4. Kultivace prašníků *Rubus bifrons*

Během měsíce června a července 2012 bylo izolováno z pupat *Rubus bifrons* celkem 3 360 prašníků (příloha 3, obr. E). Ke kultivaci bylo použito 8 variant kultivačních médií. Počet kultivovaných prašníků a výsledky regenerace na jednotlivých médiích jsou shrnuty tabulce 3.

Hodnocení bylo prováděno 3x podle harmonogramu v příloze 7, kdy byla hodnocena nekrotizace, tvorba kalusů a vzhled regenerovaných kalusů. První hodnocení probíhalo již po 3 týdnech. U kultivovaných prašníků nebyla pozorována žádná změna v regeneraci (tabulka 3). Na pohled vykazovaly tmavě hnědou až černou barvu (ihned po izolaci jsou prašníky světle zelené), a proto nebylo zcela jisté, zda prašníky již nekrotizovaly (příloha 3, obr. F).

Dva měsíce od zahájení kultivace prašníků byla pozorována kalogeneze- vznik kalusů. Celkově bylo získáno 12 kalusů na různých variantách médií (tabulka 3). Kalusy byly nažloutlé barvy, oválného tvaru, pevné a tvrdé. Kromě regenerace ve formě kalusů nebyly pozorovány žádné změny. Ostatní kultivované prašníky zůstaly beze změny, byly tmavě hnědé až černé barvy a nekrotizovaly. Zajímavým zjištěním bylo odlišné působení médií, především základních médií, bez modifikací. Regenerace kalusů probíhala po dvou měsících pouze na médiu A1 (0,16 %), B1 (1,1 %), C1 (0,4 %) a D1 (1,3 %). Na médiích, která byla modifikována, nebyly získány žádné kalusy. Lze vysvětlit, že vliv přidaných aminokyselin mohl regeneraci prašníků zpomalit. Vliv složení médií na tvorbu kalusů je také znázorněn na obrázku 15.

Závěrečné hodnocení kultivace prašníků bylo provedeno podle harmonogramu (příloha 7). Z celkového počtu 3360 izolovaných prašníků bylo po třech měsících kultivace získáno 19 kalusů různých velikostí, regenerovaných na 7 variantách kultivačních médií. Na médiu A2 nebyla pozorována žádná změna v regeneraci prašníků. Získané kalusy dosahovaly průměrné velikosti 8 mm, přičemž nejmenší kalusy měřily 3 mm a největší 16 mm (příloha 4, obr. A, B). Všechny kalusy byly nažloutlé barvy, kompaktní a pevné. Nejvíce kalusů bylo získáno na médiích B1 (1,3 %) a D1 (1,57 %). Tato kultivační média byla naprosto odlišná, jak ve složení růstových regulátorů, tak i množství použité sacharosy (viz tabulka 1). Naproti tomu na médiu A2 nedošlo k žádné regeneraci, z celkového počtu 460 prašníků nebyly získány žádné kalusy. Průměrně nejlepších výsledků dosahovala všechna základní média (A1, B1, C1, D1), která nebyla modifikována přidáním aminokyselin nebo zvýšením koncentrace sacharosy.

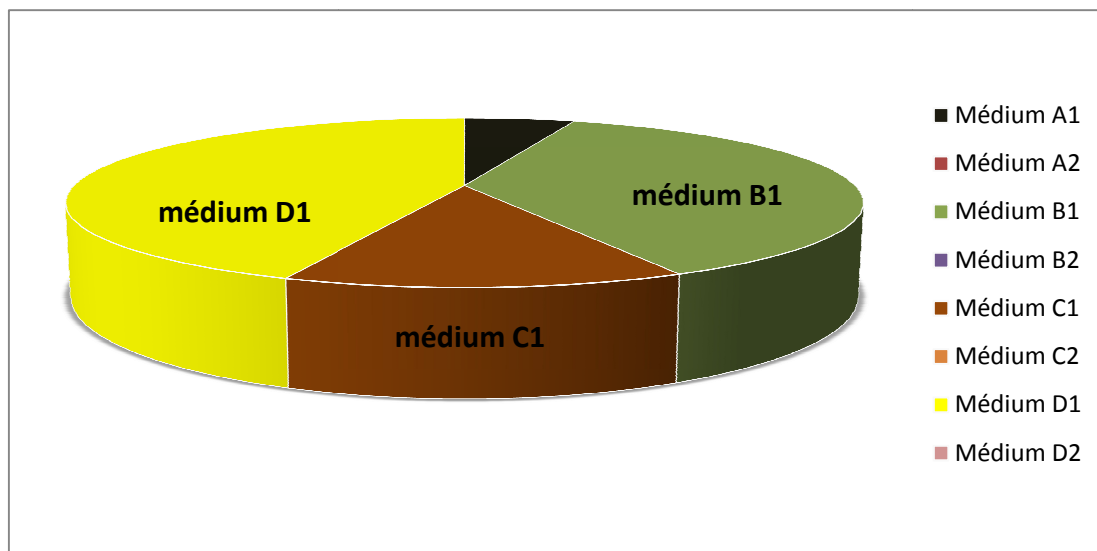
Z našich výsledků kultivace prašníků *Rubus bifrons* lze interpretovat, že koncentrace sacharosu nemá přímý vliv na regeneraci prašníků, protože kalusy byly získány jak na médiích s nízkou koncentrací sacharosu (médiu D1- 30 g/l sacharosu), tak na médiích s vysokou koncentrací sacharosu (médiu B1- 100 g/l sacharosu). Vliv glycinu a prolinu neměl výrazný vliv na regeneraci prašníků. Média B2 a C2 dosahovala slabších výsledků (1 kalus na každé variantě média), obě média obsahovala stejné množství glycinu a prolinu. Z výsledků kultivace prašníků lze usoudit, že přidáním aminokyselin (prolin, glycin) do kultivačního média nebylo dosaženo lepších výsledků. Největší získané kalusy byly rozděleny a přemístěny na médium F (složení tabulka 1) a kultivovány další dva měsíce. Výsledky kultivace prašníků u *Rubus bifrons* jsou přehledně zobrazeny v tabulce 3.

**Tabulka 3:** Průběh hodnocení kultivace prašníků u *Rubus bifrons*

Médium	Počet kultivovaných prašníků	1. hodnocení		2. hodnocení		3. hodnocení	
		Reg.** %	Kon.*** %	Reg.** %	Kon.*** %	Reg.** %	Kon.*** %
A1	600	0	0	0,16	0	0,3	0
A2	460	0	0	0	0	0	0
B1	360	0	0	1,1	0	1,3	0
B2	340	0	0	0	3,2	0,29	0
C1	500	0	3,6*	0,4	0,2	0,4	0,2
C2	300	0	0	0	0	0,3	0
D1	380	0	2,6*	1,3	3,6	1,57	0
D2	420	0	0	0	0	0,47	0

Pozn.: \* kontaminace způsobena špatnou manipulací se vzorky, nebyly zasaženy prašníků  
 \*\* regenerace (kalus)  
 \*\*\* kontaminace vzorku





**Obrázek 15:** Vliv 8 variant médií na vznik kalusů z prašníků *Rubus bifrons* (po dvou měsících kultivace)

## 5.5. Kultivace semeníků a gyneceí u *Rubus bifrons*

Z poupat, ze kterých byly odebrány prašníky, byly pro kultivaci izolovány také nezralé semeníky a celá apokarpická gynecea. Bylo izolováno a kultivováno celkem 393 semeníků na médiích A1, B1, B2, C1 a C2 (složení médií tabulka 1). Kultivovány byly také celá apokarpická gynecea- 12 gyneceí, po čtyřech kusech na médiích B2, C1 a C2. Semeníky a apokarpická gynecea byly kultivovány a hodnoceny 2x podle časového harmonogramu (příloha 7).

První hodnocení bylo provedeno po dvou měsících kultivace podle harmonogramu (příloha 7). Část semeníků bylo nekrotických, u některých semeníků došlo pouze k nekrotizaci čnělky (příloha 4, obr. E), u většiny semeníků však došlo k regeneraci kalusového pletiva na jejich bázi (tabulka 4), pravděpodobně proliferované stěny semeníků. Kultivace celých apokarpických gyneceí byla po dvou měsících také úspěšná. Ve většině případů se na bázi gynecea regenerovalo a vytvořilo kalusové pletivo (příloha 4, obr. F, příloha 5, obr. A). Všechny získané kalusy (ze semeníků a gyneceí) byly během kultivace přepasážovány na stejné médium, aby měly dostatek živin pro svůj růst. Výsledky hodnocení jsou shrnuty v tabulce 4.

Závěrečné hodnocení proběhlo čtyři měsíce od izolace semeníků a apokarpických gyneceí *Rubus bifrons* podle harmonogramu (příloha 7). Kultivaci a regeneraci kalusů

u semeníků a apokarpických gyneceí lze hodnotit jako úspěšnou, z celkového počtu 393 kultivovaných semeníků bylo získáno 64 kalusů (16,28 %). Většina získaných kalusů z nezralých semeníků vznikla pravděpodobně proliferací stěn semeníků a také na řezné bázi semeníků (příloha 5, obr. C). Tyto regenerované kalusy dosahovaly velikosti od 10 mm, přičemž největší kalusy měřily až 15 mm (příloha 5, obr. D). Kalusy získané ze semeníků byly měkčí (kalusy získané z prašníků byly pevnější), nažloutlé barvy, pravidelně ohraničené. Největší kalusy ze semeníků byly přepasážovány na kultivační médium F (složení média tabulka 1), (příloha 5, obr. B). Hodnocení kultivace semeníků a apokarpických gyneceí je zobrazeno v tabulce 4.

Z celkového počtu 12 kultivovaných apokarpických gyneceí bylo získáno 6 kalusů- získané kalusy z celých apokarpických gyneceí dosahovaly průměrně 5 mm a byly nažloutlé barvy. Tyto kalusy byly rozděleny a přemístěny na kultivační médium F (příloha 5, obr. E). Po čtyřech týdnech kultivace na médiu F byly vybrané kalusy ze semeníků a gyneceí přemístěny na kultivační média 1. a 2. (složení médií tabulka 2), která měla u těchto kalusů indukovat organogenezi.

**Tabulka 4:** Hodnocení kultivace nezralých semeníků a celých apokarpických gyneceí u *Rubus bifrons*

Médium	Rostlinný explantát	Počet kultivovaných explantátů	1. hodnocení		2. hodnocení	
			Kon.**	Reg.***	Kon.**	Reg.***
			%	%	%	%
A1	Semeníky	20	0	0	0	0
C1	Semeníky	63	0	25	0	25
C1	Apokarpické gyneceum	4	0	50	100*	50
C2	Semeníky	90	0	7,7	0	8,8
C2	Apokarpické gyneceum	4	0	50	100*	50
B1	Semeníky	200	0	9,5	0	15
B2	Semeníky	20	0	50	0	50
B2	Apokarpické gyneceum	4	0	50	100*	50

Pozn.: \* kontaminace, způsobená špatnou manipulací se vzorky

\*\* kontaminace vzorku

\*\*\* regenerace ve formě kalusu

## **5. 6. Kultivace laterálních pupenů u *Rubus bifrons***

Celkově bylo kultivováno 11 kusů segmentů s laterálními pupeny z mateřských rostlin *Rubus bifrons*. Na médiu MS doplněném o 0,01 mg/l IBA a 0,01 mg/l BAP všechny vzorky po měsíci od zahájení kultivace regenerovaly. U pěti kusů segmentů byla pozorována regenerace a laterální pupeny prorůstaly v prýty (příloha 6, obr. A, B). U zbylých šesti explantátů došlo k regeneraci ve formě kalusů. Získané kalusy byly tvrdé, zelené barvy, průměrné velikosti 2 cm (příloha 6, obr. D-F). Regenerované prýty byly pasážovány vždy po 6 týdnech na stejné svěží médium.

## **5.7. Indukce organogeneze *in vitro***

Kalusy získané kultivací prašníků, semeníků a gynecí byly přepasážovány na kultivační médium F, na kterém dále nerostly. Pro indukci organogeneze z těchto kalusů byly vybrány dvě varianty média, lišící se koncentrací sacharosu a glycinu (složení médií tabulka 2). Polovina získaných kalusů byla přepasážovaná na médium 1. a druhá polovina na médium 2. Na těchto médiích byly kalusy ponechány další 3 měsíce (příloha 5, obr. F). Kalusy měly stejnou velikost, barvu a tvar. Indukovat organogenezi ze získaných kalusů, pocházející z kultur prašníků, semeníků a gynecí *Rubus bifrons*, se nám v našich experimentech nepodařilo.

## 6. Diskuze

Technika explantátových kultur patří k biotechnologickým metodám a je v dnešní době čím dál více využívána k vegetativnímu množení rostlin, ozdravování rostlin, produkci haploidních rostlin, hybridizací vzdálených taxonomických druhů nebo k regulaci procesu oplození *in vitro*. Využití rostlinných explantátů, například v procesu šlechtění rostlin, má vždy svá úskalí. Postupy a metody, které mohou mít pozitivní výsledky u jednoho typu explantátu, pocházející z určitého genotypu, nemusí mít stejné výsledky u jiného genotypu nebo explantátu.

Předložená práce studuje možnost využití některých metod explantátových kultur (prašňkové kultury, kultury izolovaných semeníků, kultury izolovaných apokarpických gyneceí, kultury laterálních pupenů) u apomiktického druhu *Rubus bifrons*. Byla sledována úspěšnost povrchové desinfekce rostlinného materiálu, vhodné vývojové stádium pylových zrn u poupat, vliv kultivačního média a tvorba kalusu.

### 6.1. Sterilizace rostlinného materiálu

Sterilizace rostlinného materiálu je prvním a nejdůležitějším krokem při kultivaci rostlinných explantátů. Při našich experimentech s poupaty *Rubus bifrons* jsme využili dvě běžně využívaná desinfekční činidla- etanol a chloramin B. Využití etanolu je časté ke zvýšení smáčivosti rostlinného materiálu a samozřejmě také etanol slouží k povrchové desinfekci materiálu. Je však nutné zvolit vhodnou koncentraci, aby nedošlo k poškození rostlinných pletiv. V našem případě jsme použili 70% ethanol, který jsme nechali na poupata působit po dobu 1,5 min. Krátká doba byla zvolena, protože jsme využívali explantáty (prašňky, semeníky a gynecea), které nejsou v přímém kontaktu s vnějším prostředím, a proto nebylo nutné ponechávat poupata v etanolu delší dobu. Takto ošetřené explantáty během kultivace nekontaminovaly.

Využití etanolu při povrchové sterilizaci rostlinného materiálu je časté. Pozitivních výsledků dosáhli také Zhao a kol. (2006), kdy při ošetření poupat třapatky nachové (*Echinacea purpurea* L.) použili 75% etanol, který nechali působit pouhých 30 sekund a aby snížili riziko kontaminace, ošetřili explantáty 1% chlornanem sodným po dobu 15 min. Chlornan sodný je také známý jako chlorové bělidlo a běžně se využívá k desinfekci

explantátů. Podle našeho názoru je doba působení chlornanu sodného (15 min) příliš dlouhá, může hrozit poškození rostlinných pletiv a následné odumření materiálu (nekrotizace).

Dalším způsobem ošetření rostlinného materiálu může být využití roztoku chlornanu vápenatého, který se využívá k úpravě vody a také jako bělicí prášek. Roztok chlornanu vápenatého byl úspěšně použit při desinfekci pupat meruňky obecné (*Prunus armeniaca*) (Peixe a kol., 2004), ze kterých byly izolovány prašníky k indukci androgeneze. Při těchto experimentech byly do roztoku přidány také dvě kapky Tweenu-20, detergentu, který se běžně používá a má zvýšit účinnost desinfekce. Zajímavé až neobvyklé je naopak použití chloridu rtuťnatého. Při sterilizaci pupat jabloně domácí (*Malus domestica*) využili Höfer a kol. (1999) 0,1% roztok chloridu rtuťnatého, což je toxické a agresivní desinfekční činidlo, které se v biotechnologiích používá čím dál méně. Jeho využití je především při ošetřování nodálních segmentů dřevin, kdy u vzorků dochází k opětovné kontaminaci a běžná desinfekční činidla nepůsobí (Knitl, 2011).

Pokud se chceme vyhnout agresivním činidlům, kromě výše uvedených roztoků lze také při ošetření rostlinného materiálu využít chloramin B. Toto činidlo bylo použito při ošetřování jehněd vrby bylinné (*Salix herbaceae*), avšak společně s prvotním ošetřením 70% etanolem (Richterová, 2011). Roztok 2,5% chloraminu se nechal na jehnědy působit po dobu 10 min a během následné kultivace nedocházelo ke kontaminaci, ale rostlinný materiál nekrotizoval. Proto jsme pro naše experimenty zvolili ošetření pupat pouze 2,5% chloraminem B (bez předešlého působení etanolem) a to po dobu 1 min. Tento způsob sterilizace pupat byl dostačující pro následnou kultivaci prašníků, semeníků a apokarpických gyneceí *Rubus bifrons*.

## 6.2. Složení kultivačních médií

Výběr vhodného kultivačního média je dalším předpokladem pro úspěšnou kultivaci rostlinných explantátů. Při výběru média je nutno přihlédnout k tomu, jaký typ rostlinného explantátu budeme kultivovat.

Peixe a kol., (2004) při kultivaci prašníků meruňky obecné použili pro iniciaci androgeneze kultivační médium NN. K základnímu médiu přidali různé koncentrace sacharosy a růstových regulátorů, aby zjistili nejvhodnější složení média pro regeneraci prašníků. Nejlepší výsledky získali na médiu s růstovými regulátory 0,1 mg/l 2, 4– D; 0,1

mg/l zeatin a 0,5 mg/l IAA a koncentrací sacharosu 40 g/l. Úspěšnost androgeneze prašníků na takto složeném médiu Peixe a kol. (2004) uvádí až 30 %. Z těchto důvodů bylo toto médium zařazeno také do našich experimentů, avšak naše výsledky z experimentů kultivace prašníků u *Rubus bifrons* dosahovaly pouze 0,3% úspěšnost a 0 % u kultivace semeníků. I přesto, jakých výsledků dosáhli Peixe a kol. (2004) na médiu s koncentrací sacharosu 40 g/l, rozhodli jsme se přidat také variantu média s 80 g/l sacharosu (médium A2). Peixe a kol.(2004) uvádí nižší úspěšnost s touto koncentrací sacharosu kolem 2 % a naše výsledky byly 0 %. Na základě našich výsledků můžeme souhlasit se závěry Peixe a kol. (2004), že nejlepších výsledků bylo dosaženo na médiu s 40 g/l sacharosu a se zvyšující se koncentrací sacharosu úspěšnost regenerace (androgeneze, tvorba kalusu) klesá.

V našich experimentech bylo vybráno celkem 8 variant kultivačních médií. Z novějších vědeckých článků podle úspěšnosti kultivace prašníků bylo vybráno, kromě již zmíněného média NN, také médium N6 (Chu, 1978), využitě při kultivaci prašníků pšenice seté (*Triticum aktivum* L.). Toto médium obsahuje vyšší koncentraci sacharosu a to 90 g/l (oproti médiu A1). Kromě zmíněné sacharosu obsahuje médium také růstové regulátory 2 mg/l 2,4- D a 1 mg/l kinetinu. Vzhledem ke složení jsme se rozhodli pro médium B5 (Gamborg, 1968). Složení tohoto média je podobné ke složení N6 média. El- Hennawy a kol. (2011) ve své práci uvádí úspěšnost indukce kalusů 18 % ze 100 kultivovaných prašníků u pšenice, zatímco naše výsledky na médiu C1 dosahovaly 0,4 % při kultivaci 500 prašníků, 0 % při kultivaci 63 semeníků a 100 % při kultivaci 4 gyneceí. Kultivační médium C1 jsme se rozhodli pozměnit, proto jsme do média přidali 100 mg/l prolinu a 40 mg/l glycinu. Tyto aminokyseliny se běžně vyskytují v prašnicích a fungují zde jako osmoprotektanty, tj. nízkomolekulární látky, které se akumulují při stresových podmínkách a svou vazbou na proteiny a membrány přispívají k zachování struktury makromolekul (Lábusová, 2010). Také jsou běžnou součástí některých základních médií (například MS médium, které obsahuje 2 mg/l glycinu). Z celkového počtu 300 kultivovaných prašníků na médiu C2 bylo procento úspěšnosti tvorby kalusu 0,3 %, z 90 semeníků 0 % a ze 4 gyneceí 100 %.

Reakce prašníků závisí nejen na výběru základního média, ale také na koncentraci růstových regulátorů. Médium D1, které jsme si vybrali na základě studia literatury, je složeno z MS média a je doplněno o růstové regulátory 1 mg/l BA; 0,5 mg/l 2, 4- D a 0,1mg/l kinetinu. Vše je doplněno sacharosou o koncentraci 30 g/l. Song a kol. (2007) toto médium využili při kultivaci prašníků okurky seté (*Cucumis sativus* L.). Na médiu D1 jsme dosáhli nejlepších výsledků z celého našeho výzkumu a to 1,57 % získaných kalusů z počtu 380

kultivovaných prašníků. Médium jsme taktéž modifikovali zvýšením koncentrace sacharosu na 100 g/l (médium D2). Z našich výsledků vyplývá, že zvýšená koncentrace sacharosu vede ke snížení úspěšnosti regenerace, na takto modifikovaném médiu došlo k regeneraci pouze u 0, 47 % prašníků. Zajímavostí je však skutečnost, že naše výsledky, pokud porovnáme úspěšnost všech variant médií použitých v experimentech, tuto domněnku nepotvrzují. Nejlepších výsledků jsme totiž dosáhli jak na médiu s nízkou koncentrací sacharosu (médium D1) tak i na médiu s velmi vysokou koncentrací sacharosu (médium B1).

Explantáty z daného genotypu rostlin můžeme úspěšně kultivovat na určitém kultivačním médiu, ale to neznamena, že stejně úspěšných výsledků dosáhneme na tomto médiu u explantátů jiného genotypu. Toto je základní problém biotechnologických metod, který lze vyřešit pouze optimalizacemi, popř. výběrem jiného vhodného média pro daný genotyp.

### **6.3. Indukce organogeneze *in vitro***

Kalusy získané v našich experimentech z prašníků, semeníků a gynecí jsme po určité době přesadili na média, která by měla svým složením indukovat vznik organogeneze. Byly vybrány dvě varianty média- médium 1. a médium 2. Jedná se o základní médium MS, doplněné o růstové regulátory BAP a NAA a o dvě koncentrace sacharosu (30 g/l a 50 g/l). BAP měl stimulovat tvorbu prýtlů, zatímco NAA měl indukovat tvorbu postranních kořenů. Na těchto médiích jsme však nezískali z kalusů organogenezi. Také Zhao a kol. (2006) se snažili o indukci organogeneze kalusů z prašníků třapatky nachové. Stejně jako v našich experimentech použili MS médium doplněné o BAP a NAA. Na rozdíl od našich výsledků však dokázali indukovat z kultivovaných kalusů prýty. Tyto rozdílné závěry jsou výsledkem odlišného genotypu rostlin, ze kterých byly explantáty použity. Podobných výsledků dosáhli také El- Hennawy a kol. (2011), když získané kalusy z prašníků pšenice seté přesadili na MS médium doplněné o NAA a kinetin a také na takto připraveném médiu indukovali prýty.

## 6. 4. Využití biotechnologických metod u rodu *Rubus* sp.

V rámci této diplomové práce jsme zaměřili na jeden druh ostružiníku a to na druh *Rubus bifrons*. Z tohoto druhu jsme pro účely kultivace použili nezralé prašníky, semeníky a také celá apokarpická gynecea. Kdyby náš výzkum byl úspěšný, dokázali bychom z kalusů prašníků získat rostliny, které by měly haploidní sadu chromozomů a tím by posloužily pro další studie. Toto je prvotní důvod, proč se z rostlin kultivují nezralé prašníky, mikrospory nebo nezralá vajíčka (Richterová, 2011).

U rodu *Rubus* sp. se ke kultivaci nevyužívají pouze prašníky nebo mikrospory, běžná je také mikropropagace rostlin, kde je cílem rychlé namnožení a naklonování rostlinného materiálu. Obecně lze konstatovat, že čím větší rostlinný explantát ke kultivaci použijeme, tím lepších výsledků dosáhneme. Z toho vyplývá, že právě mikrosporové kultury, prašníkové kultury nebo kultury nezralých vajíček jsou pro kultivaci nepředvídatelným materiálem.

Kultivací axilárních pupenů z různých kultivarů rodu *Rubus* sp. získali Bobrowski a kol. (1996) dospělé rostliny. Ve svých závěrech také potvrzují fakt, že na míru zmnožení rostlin má vliv typ genotypu a také různé koncentrace růstových hormonů (Bobrowski a kol., 1996). Axilární pupeny ze 3 druhů ostružiníků (*Rubus hirsutus*, *Rubus lambertianus*, *Rubus columellaris*) použili pro namnožení pomocí biotechnologických metod také Wei a kol. (1992). Kultivací na médiu MS doplněném o růstové regulátory získali rostlinky, které poté přesadili do půdy ve sklenících.

Kultivovat lze také izolované meristémy či dormantní pupeny rodu *Rubus* sp., takto lze na vhodném kultivačním médiu docílit proliferaci kořenů a postranních výhonků (Gajdošová a kol., 2006). Velice oblíbenou biotechnologickou metodou je kultivace a následné namnožení rostlin z listových explantátů. V roce 1990 Swartz a kol. (1990) použili listy rodu *Rubus* sp., které následně kultivovali a dosáhli tak proliferace kořínek a postranních výhonků. Podobné výsledky získali také Turk a kol. (1994). Na různých kultivačních médiích dosáhli u listů regeneraci ve formě výhonků. V závěru své práce upozorňují na skutečnost, že nejlepších výsledků a tudíž nejvyšší počet výhonků získali z mladých listů. Vysoké frekvence regenerace prýtů (91,7 %) z kultivovaných listů rodu *Rubus* sp. se podařilo získat také v práci Gupta a Mahalaxmi (2009).

Androgeneze není však do dnešní doby u rodu *Rubus* sp. dostatečně prostudována. Gynogeneze není u ovocných stromů studována vůbec (<http://ig.bas.bg>).



## 7. Závěr

Tato diplomová práce se zabývá primárně kultivací prašníků ostružiníku dvojbarevného (*Rubus bifrons*), tetraploidního druhu, který se v přírodě rozmnožuje převážně apomikticky. Indukce kalusů s následnou organogenezí by vedla k získání dospělých rostlin, které by měly haploidní sadu chromozomů (v případě *Rubus bifrons* by se jednalo o dihaploidy) a tím by přispěly k dalšímu studiu genomu tohoto druhu. V rámci této práce jsme kultivovali kromě 3 360 prašníků také 393 nezralých semeníků, 12 celých apokarpických gyneceí a 11 laterálních pupenů.

- Pro prašnickovou kulturu jsou nevhodnější poupata o velikosti 6 mm, obsahují prašníky s mikrosporami v jednojaderném stádiu. Životnost mikrospor dosahovala 57,3 %.
- Celkově bylo kultivováno 11 segmentů s laterálními pupeny z mateřských rostlin *Rubus bifrons*. Pět kusů segmentů regenerovalo ve formě prorůstání prýtů, šest explantátů regenerovalo ve formě kalusů.
- Při sterilizaci poupat je vhodné použít neagresivní desinfekční prostředky, jako vyhovující je použití 70% ethanolu po dobu 1,5 minuty nebo 2,5% chloraminu B po dobu 1 minuty. Není potřeba poupata vystavovat delšímu působení činidel.
- Laterální pupeny je vhodné sterilizovat pomocí dvou druhů desinfekčních činidel a to 70% etanolem po dobu 1 minuty a poté 2,5% chloraminem B po dobu 10 minut.
- Prašníky byly kultivovány na 8 variantách kultivačních médií. Nejlepší výsledky byly dosaženy na médiu B1 a D1, nejlepší výsledky kultivace semeníků byly na médiu B2.
- Celkově bylo získáno kultivací prašníků 19 kalusů. Indukovat organogenezi se nám u těchto kalusů nepodařilo potvrdit. Je potřeba optimalizovat kultivační média, která by vyvolala organogenezi.
- Na kultivaci prašníků, semeníků a gyneceí nemá vliv koncentrace sacharosu.
- Přidáním aminokyselin (prolin, glycin) k médiu (C2, B2) nebylo dosaženo lepších výsledků regenerace prašníků.

## 8. Seznam použité literatury:

- Blatný, C. (1971): Rybízy, angrešty, maliníky a ostružiníky. Praha: Academia.
- Cronquist, A. (1988): The evolution and systematics of flowering plants. Ed. 2. - New York.
- Bobrowski, V. L., Mello-Farias, P. C., Peters, J. A. (1996): Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. *Revista Brasileira de Agrociencia*. 17-20.
- Briggs, D., Walters, S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. - Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Dobránszki, J., Jaime, A., Teixeira, S. (2010): Micropropagation of apple — A review. *Biotechnology Advances*. Volume 28, Issue 4, Pages 462–488.
- Donoghue, M. J., Eugenia Y. Y. L. (2012): Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (*Pyraea*, *Rosaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 63 230–243.
- El-Hennawy, M. A., Abdalla, S. A., Shafey, I. M. A. (2011): Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Annals of Agricultural Science*. 56. 63–72.
- Gajdošová, A., Ostrolucká, M. G., Libiaková G., Ondrušková, E., Šimala, D. (2006): Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* Vol. 14 (Suppl. 1).
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968): Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Experimental Cell Research*, vol. 50, pp. 151–158.

- Guha, S., Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, Vol. 204, No. 4957, pp. 497, ISSN 0028-0836.
- Gupta, S., Mahalaxmi, V. (2009): *In vitro* high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. Scientia Horticulturae. 120. 22–26.
- Hadač, E. (1967): Praktická cvičení z botaniky. – SPN, Praha.
- Hall, R. D. (1999): Plant cell culture protocols. Totowa .Humana Press.
- Harn, C., Kim, M. Z. (1972): Induction of casus from anthers of *Prunus armeniaca*. Korean Journal of Breeding. 4:49–53.
- Höfer, M., Touraev, A., Heberle-Bors, E. (1999): Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. Plant Cell Reports. 18 : 1012–1017.
- Holub, J. (1995): *Rubus*. In: Slavík, B. (Ed.). (1995): Květena České republiky 4. – Academia, Praha.
- Horáček, P. (2007): Encyklopedie listnatých stromů a keřů. Computer Press- Praha.
- Hradilík, J. (2005). Rostlinné explantáty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. - Brno.
- Chu, C. C. (1978): The N6 Medium and Its Applications to Anther Culture of Cereal Crops, Proceedings Symposium. Plant Tissue Culture, Beijing: Science, pp. 43–50.
- Kamenická, A., Rypák, M. (1989): Explantáty v rozmnožování dřevín, Acta Dendrologica, Veda,- Bratislava.
- Keller, W. A., Rajhathy, T., Lacapra, J. (1975): *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 17 (4): 655 – 665.

- Knitl, M. (2011): Využití mikropropagace u vybraných druhů ohrožených dřevin. Bakalářská práce. Univerzita Palackého. Přírodovědecká fakulta. - Olomouc.
- Koblížek, J., Maděra, P., Tichá, S., Úředníček, L. (2009): Dřeviny České republiky, Vyd. 2., Lesnická práce, s.r.o., Brno.
- Kováč, J. (1995): Explantátové kultury rostlin, 1. přepracované vydání. Univerzita Palackého. Přírodovědecká fakulta. - Olomouc.
- Kunitake, H., Imamizo, M., Masahiro, M. (1993): Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). Plant Science. Volume 90, Issue 2, Pages 187–194.
- Landa, Z., Kocourek, F. (1973): Indukce haploidů v prašnickových a pylových kulturách in vitro, In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Lábusová, J. (2010): Fytoremediace: biochemické charakteristiky rostlin hyperakumulujících těžké kovy. Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta. Praha.
- Luštinec, J., Žárský, V. (2005): Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Nakladatelství Karolinum. – Praha.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 474–497.
- Navrátilová, B., Skálová, D., Vašut, R. J. (2012): Poznáváme plody rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.
- Novák, F. J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia, Praha.

- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., Ahuja, P. S. (2006): *In vitro* propagation of rose-a review. *Biotechnology Advances*. Volume 24, Issue 1. Pages 94–114.
- Peixe, A., Barroso, J., Potes, A., Pais, M. S. (2004): Induction of haploid morphogenic calluses from *in vitro* cultured anther of *Prunus Armeniaca* cv. ‘Harcot’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77: 35–41.
- Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chetrit, P., Remy, R., Rousselle, P., Renard, M. (1983): Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Molecular Genetics*. 191, 244-250.
- Richterová, L. (2011): Využití *in vitro* kultivace nezralých vajíček u vybraných druhů ohrožených dřevin. *Bakalářská práce*. Univerzita Palackého. Přírodovědecká fakulta. - Olomouc.
- Savel'ev, N. I., Oleinikova, O. Y., Il'ina, N. S., Turovtseva, E. S., Chivilev, V. V. (2010): *In Vitro* Androgenesis of Fruit and Berry Plants. *Russian Agricultural Sciences*. Vol. 36. No. 1.15–17.
- Slavík, B. (1995): *Květena České republiky 4*. – Academia, Praha.
- Song, H., Qun-Feng, L., Xiang-Dong, L., Wolukau, J. N., Wei-Ping, D., Chun-Tao, Q., Jin-Feng, Ch. (2007): Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* . 90:245–254.
- Swartz, H. J., Bors, R., Mohamed, F. Naes , K. (1990): The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Volume 21, Issue 2, pp 179-184.
- Šarhanova, P., Vašut, R. J., Dančák, M., Bureš, P., Trávníček, B. (2012): New insights into the variability of reproduction modes in European populations of *Rubus* subgen. *Rubus*: how sexual are polyploid brambles?. *Sexual Plant Reproduction* . 25:319–335.

- Šmíd, M. (2002): Průvodce odbornými názvy rostlin, Vyd. 2., Nakladatelství Brázda, Praha.
- Talent, N. (2009): Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from Maloid *Rosaceae*. *Theory in Biosciences*. 128: 121–138.
- Tang, H., Zhenglong, R., Krczal, G. (2000): Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.). *Scientia Horticulturae*. Volume 83, Issue 2. Pages 109–126.
- Trávníček, B., Zázvorka, J. (2005): Taxonomy of *Rubus* ser. *Discolores* in the Czech Republic and adjacent regions. - *Preslia*, Praha, 77: 1–88.
- Trávníček, B., Oklejewicz, K., Zielinski, J., (2005): *Rubus ambrosius* (*Rubus* Subsect. *Rubus*, *Rosaceae*), a new bradle species from the eastern part of central Europe. *Folia Geobotanica*. 40: 421–434.
- Trávníček, B., Havlíček, P., Krahulcová, A. (2000): Ostružiníky - pozoruhodné rostliny naší přírody (I). – *Živa*. Praha. 156-158.
- Trigiano, R. N., Gray, D. J. (2005): *Plant development and biotechnology*, Press, Boca Raton, London.
- Truhlářová, K. (2012): Reprodukční mechanismy u vybraných druhů ostružiníků (*Rubus*, *Rosaceae*). Bakalářská práce. Univerzita Palackého. Přírodovědecká fakulta. - Olomouc.
- Turk, B. A., Swartz, H. J., Zimmerman, R. H. (1994): Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Volume 38, Issue 1, pp 11-17.
- Valíček, P. (2002): *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. – Academia, Praha.

- Vinter, V. (2012): Základy anatomie cévnatých rostlin [online]. - Vystaveno roku 2012 [cit. 20. 3. 2013]. Dostupné na < <http://old.botany.upol.cz/atlasy/anatomie/index.html> >.
- Vyskot, B., Novák, F. J. (1973): Příspěvek ke studiu androgeneze *in vitro* u některých druhů rodu *Nicotiana* L., In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Vyvadilová, M., Klíma, M., Kučera, V. (2008): Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé. Výzkumný ústav rostlinné výroby. - V. V. I. Praha – Ruzyně.
- Wei, J., Ying, G., Shen-Zhi, Z. (1992): *In vitro* propagation of *Rubus* species. Scientia Horticulturae. Volume 49. 335–340.
- Zhao F., Dahanayake, N., Yue-Sheng, Y., Wu, H. (2006): Anther culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86:55–62.

## 8.1. Seznam použitých internetových zdrojů

- <http://botany.cz/cs/rubus-saxatilis/>
- <http://www.naturabohemica.cz/rubus-idaeus/>
- <http://www.naturabohemica.cz/rubus-chamaemorus/>
- [www.petlit.cz](http://www.petlit.cz)
- <http://ig.bas.bg>

## 9. Přílohy

### Příloha 1- *Rubus bifrons* na pozemcích katedry botaniky

**A, B-** *Rubus bifrons*- 20. 6. 2012, **C-** uchycení rostlin *Rubus bifrons*,

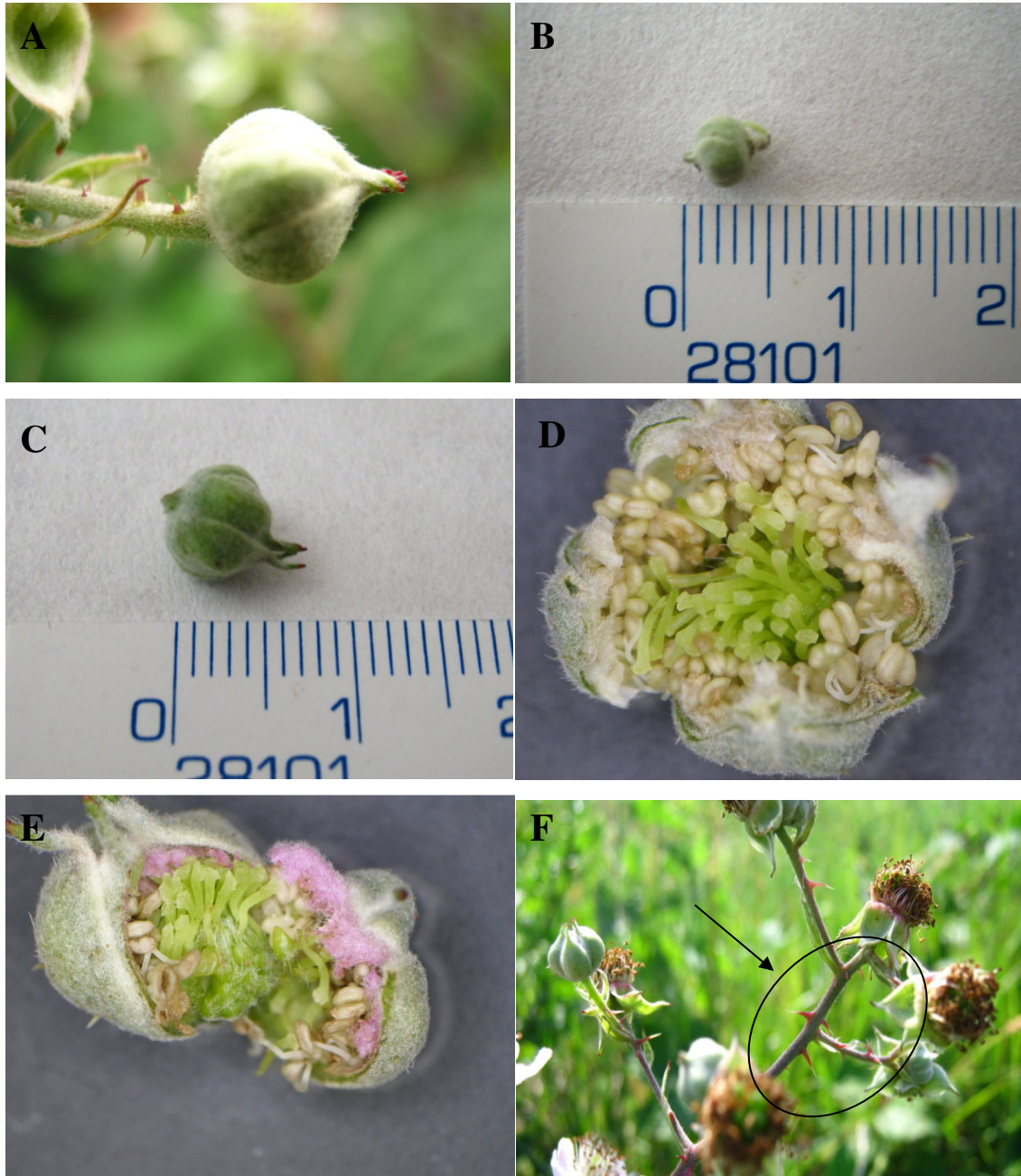
**D, E-** *Rubus bifrons*- 20. 8. 2012, **F-** *Rubus bifrons*- 20. 9. 2012





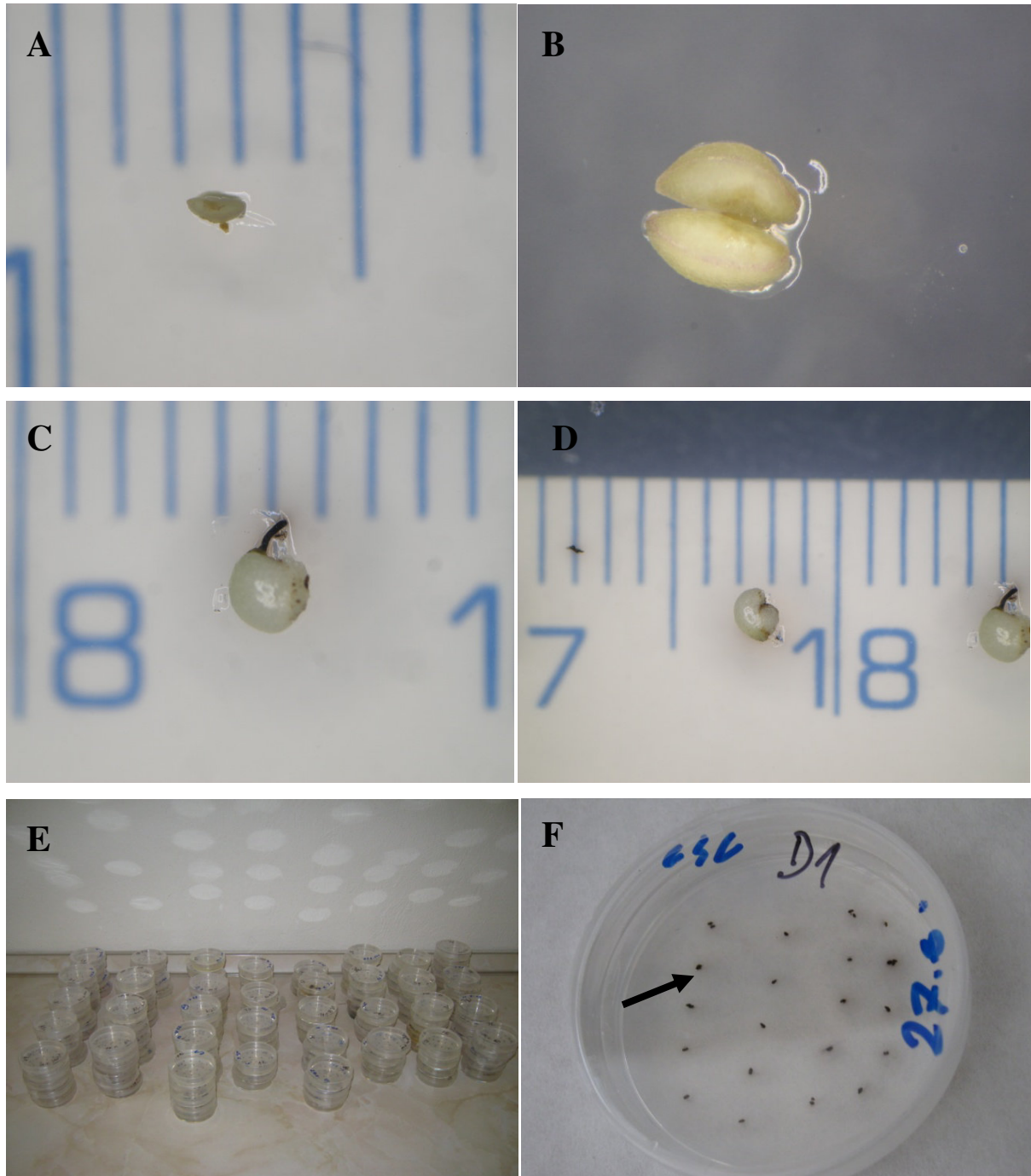
## Příloha 2- Fotodokumentace rostinného materiálu

**A-** poupě *Rubus bifrons* na mateřské rostlině, **B-** poupě *Rubus bifrons* o velikosti 4 mm, **C-** poupě *Rubus bifrons* o velikosti 6 mm, **D-** otevřené poupě o velikosti 3-4 mm, **E-** otevřené poupě o velikosti 5-6 mm, **F-** laterální pupeny *Rubus bifrons*



### Příloha 3- Izolované kultury *Rubus bifrons*

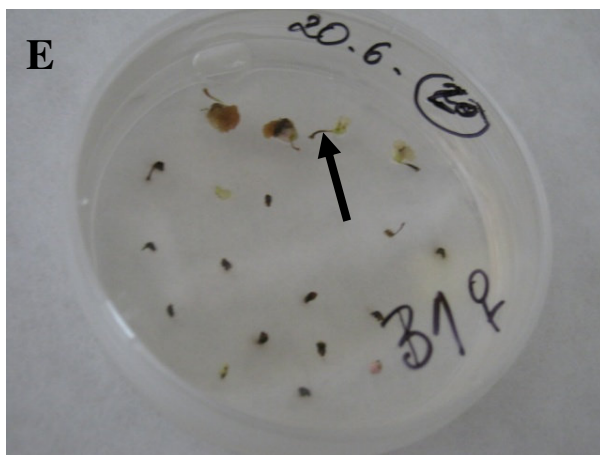
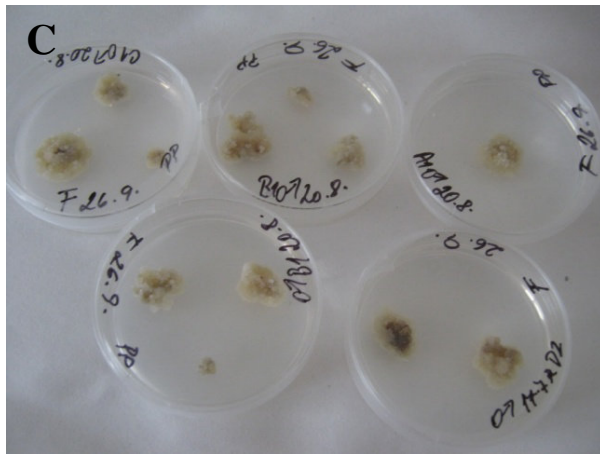
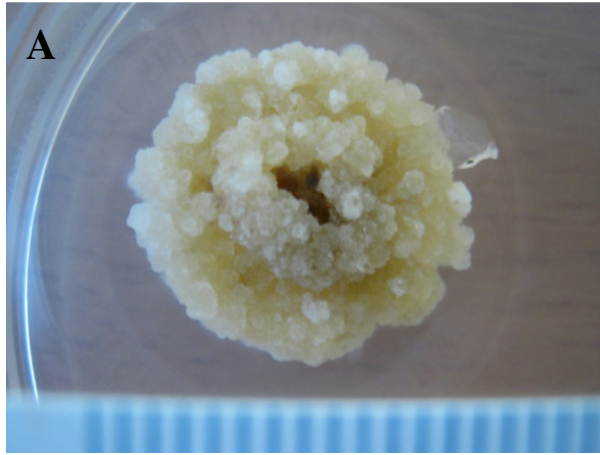
**A, B-** izolovaný prašník o velikosti 1 mm, **C,D-** izolované semeníky o velikosti 2 mm, **E-** Petriho misky s kultivovanými prašníky, **F-** nekrotizované kultivované prašníky



## Příloha 4- Fotodokumentace kalusů z prašníků, semeníků a gyneceí

**A, B-** kalusy získané kultivací prašníků, **C, D-** kalusy z prašníků na médiu F,

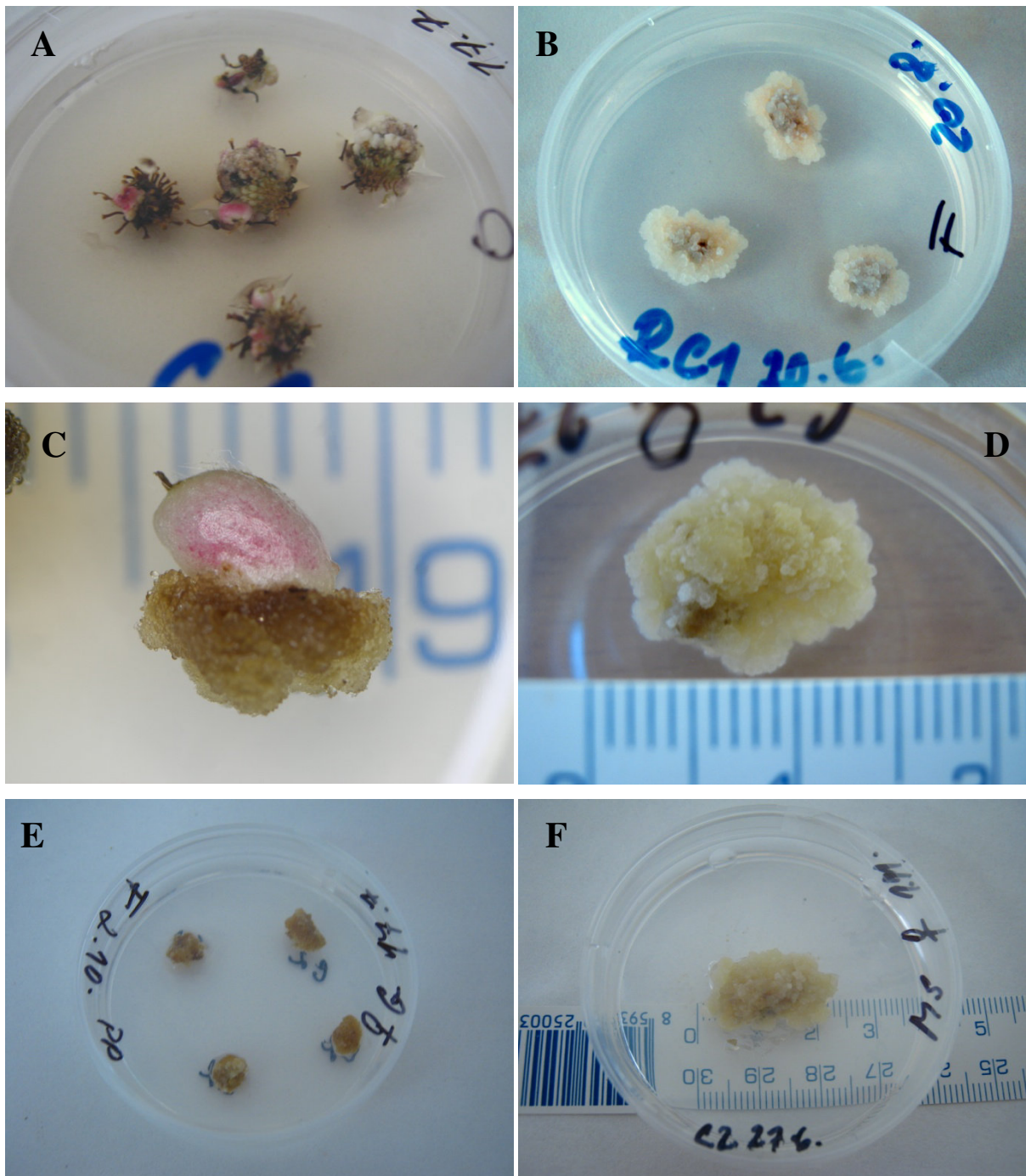
**E-** kultivované semeníky (nekrotizace čnělek), **F-** gyneceum- prorůstající kalusové pletivo



## Příloha 5- Fotodokumentace kalusů ze semeníků a gynecí

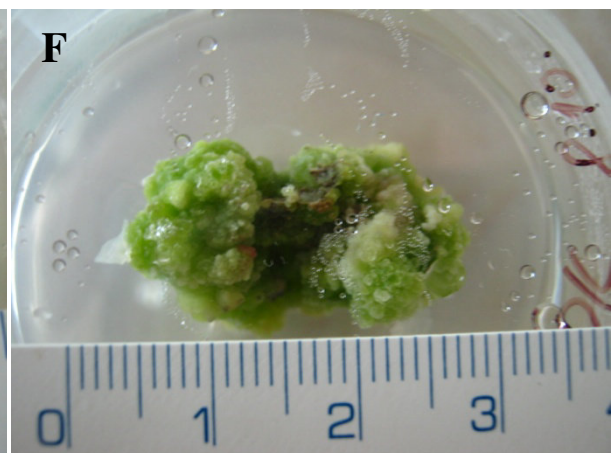
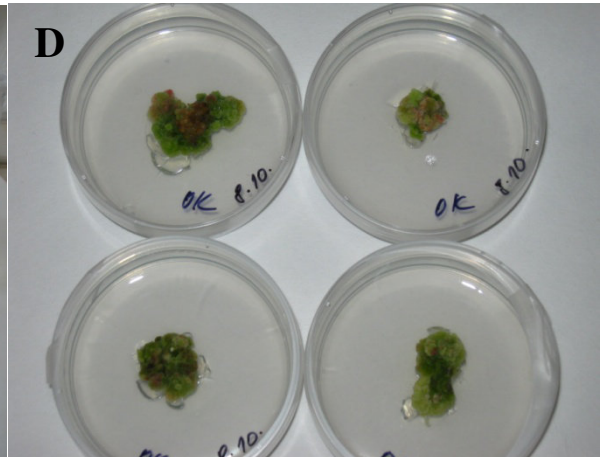
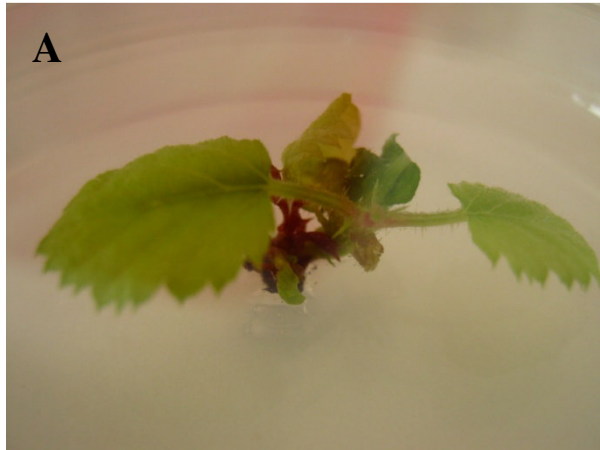
**A-** gynecia- prorůstající kalusové pletivo, **B-** kalusy ze semeníků na médiu F,

**C-** semeník- prorůstající kalusové pletivo, **D-** kalus získaný kultivací semeníků, **E-** kalusy z gynecí na médiu F, **F-** kalus ze semeníku na médiu MS, určené k indukci organogeneze









## Příloha 6- Regenerace laterálních pupenů *Rubus bifrons*

**A, B**- regenerace ve formě prorůstání prýtů, **C**- regenerované laterální pupeny po pasáži v Erlenmeyerově baňce, **D**- regenerace ve formě kalusů, **E,F**- kalusy o velikosti 2 cm



## Příloha 7- Časový harmonogram experimentů

### Měsíc

<b>VI.</b>	 <p>20. 6. 2012 sběr poutat, izolace prašníků, semeníků a gynecí 27. 6. 2012 sběr poutat a laterálních pupenů, izolace prašníků a laterálních pupenů</p>
<b>VII.</b>	 <p>11. 7. 2012 první hodnocení kultivace prašníků</p>
<b>VIII.</b>	 <p>20. 8. 2012 druhé hodnocení kultivace prašníků 20. 8. 2012 první hodnocení kultivace semeníků a apokarpických gynecí</p>
<b>IX.</b>	 <p>27. 9. 2012 třetí hodnocení kultivace prašníků</p>
<b>X.</b>	 <p>2. 10. 2012 druhé hodnocení kultivace semeníků a apokarpických gynecí</p>
<b>XI.</b>	 <p>1. 11. 2012 přepasážování vybraných kalusů a následná kultivace na médium MS</p>
<b>XII.</b>	