

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zahradnictví**



**Mikropropagace listoklasce (*Phyllostachys*) v podmínkách  
*in-vitro***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Martina Kadavá**

**Vedoucí práce: Ing. Pavel Matiska, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Mikropropagace listoklasce (*Phyllostachys*) v podmínkách *in-vitro*" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015

---

# 1 Obsah

2	Úvod.....	7
3	Cíl práce.....	8
4	Přehled literatury (literární rešerše).....	9
4.1	<b>Phyllostachys</b> .....	9
4.1.1	Botanické zařazení, čeleď <i>Poaceae</i> - Lipnicovité .....	9
4.1.2	Morfologie .....	11
4.1.3	Popis rodu <i>Phyllostachys</i> .....	14
4.2	<b>In-vitro množení</b> .....	17
4.2.1	Živná média.....	17
4.2.2	Totipotence rostlinné buňky.....	17
4.2.3	Metoda kultivace jednonodálních segmentů.....	18
4.2.4	Materiál pro odvození explantátové kultury .....	18
4.2.5	Sterilizace odebraného materiálu.....	18
4.2.6	Multiplikace .....	19
4.2.7	Zakořeňování <i>in-vitro</i> .....	20
4.2.8	Zakořeňování <i>in-vivo</i> a aklimatizace .....	21
4.3	<b>Růstové regulátory</b> .....	22
4.3.1	Fytohormony.....	22
4.4	<b>Množení rodu <i>Phyllostachys</i> v podmínkách <i>in-vitro</i></b> .....	23
4.4.1	Sterilizace .....	23
4.4.2	Multiplikace .....	23
4.4.3	Zakořeňování .....	24
5	<b>Materiál a metody</b> .....	24
5.1	<b>Příprava materiálu a jeho zpracování</b> .....	24
5.1.1	Rostlinný materiál - odběr primárních explantátů .....	24
5.1.2	Živná média, jejich příprava a složení.....	25
5.1.3	Sterilizace média .....	25
5.1.4	Příprava materiálu, sterilizace explantátů .....	25
5.2	<b>Kultivace materiálu</b> .....	26
5.2.1	Kultivace v kultivační místnosti.....	26
5.2.2	Pasážování.....	26
5.2.3	Kultivace v zakořeňovacím médiu .....	26

5.3	Statistické zpracování dat .....	27
6	Výsledky .....	28
6.1	Vyhodnocení metod sterilizace .....	28
6.2	Vyhodnocení multiplikačních médií .....	30
6.3	Vyhodnocení zakořeňovacích médií .....	31
7	Diskuze .....	32
8	Závěr .....	34
9	Seznam literatury .....	35
10	Seznam použitých zkratk .....	37
11	Samostatné přílohy .....	38



## **Poděkování**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) panu Ing. Pavlu Matiskovi Ph.D. za pomoc při vytváření této práce.

# Mikropropagace listoklasce (*Phyllostachys*) v podmínkách *in-vitro*

## Souhrn

Tato práce se věnuje mikropropagaci vybraných druhů rodu *Phyllostachys* v kulturách *in-vitro*. Cílem je testování účinnosti sterilizace, ovlivnění multiplikace různými růstovými látkami, složení zakořeňovacích médií a jejich vliv na výsledný růst preparátů.

Hypotézou je zvýšení počtu výhonů díky dodáním cytokininů do plného MS (Murashige a Skoog) média (BAP - benzylaminopurin, TDZ - thidiazuron), případně v kombinaci s auxiny do média ve fázi multiplikace a tím i zvýšení množitelského koeficientu u sledovaných rostlin.

Pro *in-vitro* propagaci byl zvolen odběr nodálních segmentů z rostlin izolovaných ve skleníku. Po následné sterilizaci byly explantáty umístěny do plného MS multiplikačního média s obsahem různých koncentrací cytokininů, případně auxinů. Z hlediska průměrného počtu výhonů statisticky nejlepších výsledků dosahovaly koncentrace cytokininů BAP ( $5\text{mg.l}^{-1}$ ) a TDZ ( $2\text{ mg.l}^{-1}$ ).

Cílem bylo též testování účinnosti sterilizace. Testován byl Chlornan sodný ve 3 různých koncentracích působící různou dobu. Statisticky nejlepších výsledků v poměru kontaminace a následné regenerace dosahoval chlornan sodný v koncentraci 0,47 % působící po dobu 10 minut a po dobu 20 minut.

Různé varianty složení zakořeňovacích médií se ukázaly být nedostatečné, protože se ani v jedné variantě nepodařilo iniciovat tvorbu kořenů. Byla zvolena média, která podle vědeckých článků měla úspěšnost zakořenění u podčeledi *Bambusoideae* až 90% úspěšnost. K zakořeňování *in-vitro* byly použity regulátory NAA ( $5\text{ mg.l}^{-1}$ ), IBA ( $10 - 20\text{ mg.l}^{-1}$ ), Coumarin ( $40 - 80\text{ mg.l}^{-1}$ ), IAA ( $5\text{ mg.l}^{-1}$ ) a NAA ( $5\text{ mg.l}^{-1}$ ). Část prýtů bylo převedeno *ex vivo* do pěstebního substrátu. Žádná z použitých variant však nevedla k docílení zakořenění.

**Klíčová slova:** in vitro propagace, kultivační médium, listoklasec, *Phyllostachys*, růstové látky, sterilizace.

# Micropropagation of *Phyllostachys* in condition *in-vitro*

## Summary

This paper focuses on the micropropagation of selected species of the genus *Phyllostachys* in *in-vitro* cultures. The goal was to test the efficiency of sterilization, influencing the multiplication through various growth substances and the composition of rooting media, and their final effect on the specimens' growth.

The hypothesis being tested is that an increase in the number of shoots can be attained through the introduction of cytokinins into the complete MS (BAP - benzylaminopurine, TDZ – thidiazurone) medium, optionally combining this with the addition of auxins in the multiplication phase, which would lead to the increase of the multiplication coefficient of selected plants.

The *in-vitro* propagation was tested on nodal segments of plants isolated in greenhouses. After their sterilization, the explantates were placed into full MS multiplication medium with various concentration of cytokinins and optionally, auxins. As far as the average number of shoots is concerned, the BAP (5 mg.l<sup>-1</sup>) a TDZ (2 mg.l<sup>-1</sup>) cytokinins proved to be the most successful.

The secondary goal was the testing of the efficiency of sterilization. The target, sodium hypochlorite, was tested in three different concentrations, each acting for various times. Statistically, the most favorable result in the ratio of contamination and subsequent regeneration was reached with sodium hypochlorite in 0.47% concentration, acting either for 10 or 20 minutes.

Different composition variants of the rooting media were shown to be insufficient, as none of them managed to initiate the rooting process. The media chosen were quoted to have the rooting success rates of up to 90% with the subfamily Bambusoideae, according to science journals. For *in-vitro* rooting, the regulators used were: NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>), IBA (10 - 20 mg.l<sup>-1</sup>), Coumarin (40 - 80 mg.l<sup>-1</sup>), IAA (5 mg.l<sup>-1</sup>), and NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>). A portion of the shoots was transferred into the growth substrate *ex-vivo*. None of the variants led to a successful rooting, however.

Keywords: *in-vitro* propagation, cultivation medium, *phyllostachys*, growth stimuli, sterilization



## 2 Úvod

Mikropropagace rostlin se v tržním zahradnictví používá čím dál více. Při dostatečném objemu produkce jsou rostliny i stejně drahé nebo levnější než u vegetativně či generativně množených rostlin tradičními způsoby. Při množení *in-vitro* jsou rostliny zdravé a viruprosté. Mnohdy se touto metodou pěstují rostliny, které se tradičními metodami dají množit jen pomalu a nebo vůbec.

K testování byl vybrán rod *Phyllostachys*. Vzhledem k tržnímu potenciálu a obtížnosti množení a tím pádem jeho vysoké pořizovací ceně. Bambusy se generativně dají množit jen okrajově (vzhledem k jejich mnohdy až stoletým kvetoucím cyklům), vegetativně množené rostliny potřebují velký prostor, nevypadají esteticky dobře a dlouho se dopěstovávají. Zatímco bambusy množené *in vitro* by měly pěkný hustý habitus semenáčků.

U vybraných druhů rodu *Phyllostachys* (*Phyllostachys aureosulcata*, *Phyllostachys vivax* a *Phyllostachys nuda*) se testuje účinnost sterilizace při použití různých koncentrací chlornanu sodného. Dále se testuje vhodnost různých médií k multiplikaci a účinnost zakořeňovacích médií.

### 3 Cíl práce

Hlavním cílem práce je optimalizace mikropropagace vybraných druhů rodu *Phyllostachys* v kulturách *in-vitro*. Cílem je též testování účinnosti sterilizace. Pro sterilizaci byl zvolen Chlornan sodný v různých koncentracích, působící 10 - 30 minut. Optimálním výsledkem je ta varianta, která umožňuje vysoké procento regenerace s malým procentem kontaminace.

Optimalizace multiplikace explantátů se testuje na plném MS médiu, s přidáním cytokininů a případně auxinů. Testuje se ovlivnění multiplikace těmito růstovými látkami. Hypotézou je zvýšení počtu výhonů díky dodáním cytokininů (BAP - benzylaminopurin, TDZ - thidiazuron) do média ve fázi multiplikace a tím i zvýšení množitelského koeficientu u sledovaných rostlin.

Po fázi multiplikace je cílem práce testovat přidání růstových látek pro iniciaci zakořenění explantátů. Hypotézou je iniciace zakořeňování přidáním NAA (Naphthalene acetic acid), IBA (Indole-3-butyric acid), Coumarinu a IAA (indole -3- acetic acid).

## 4 Přehled literatury (literární rešerše)

### 4.1 *Phyllostachys*

#### 4.1.1 Botanické zařazení, čeleď *Poaceae* - Lipnicovité

Rostliny této čeledi jsou byliny, často s adventivními kořeny, někdy s mykorhizou. Stonky (stébla) jsou jednoduché nebo větvené, vzpřímené nebo poléhavé, válcovité, obvykle duté v internodiích, nody plné. Někdy dřevnatějící (bambusy). Listy střídavé ve 2 řadách, na protistojných stranách stonku, původně na nodech, často však nahloučené u báze. Rozlišené jsou na čepel (*lamina*) a pochvu (*vagina*), na jejich rozhraní bývá jazýček (*ligula*) a ouška (*ariculae*). Pochva těsně objímá stonek, její okraje se překrývají, ale zpravidla nesrůstají (otevřená pochva). Jazýček je obvykle blanitý, někdy přeměněný na štětiny nebo chlupy. Čepel je jednoduchá, obvykle úzká, čárkovitá s rovnoběžnou žilnatinou.

Anatomická stavba listů není jednotná a závisí na tom, jak se v rostlinách uskutečňuje fotosyntéza, či jde o rostliny typu  $C_3$  (plezimorfický znakový stav) a nebo o rostliny typu  $C_4$  (apomorfický znakový stav).  $C_3$  rostliny mají běžnou stavbu listů a fotosyntézu, která je účinná hlavně v mírném a chladném pásmu.  $C_4$  rostliny mají cévní svazky v listech obalené parenchymatickou vrstvou, kolem které je věnec mezofylových buněk, který je výhodný pro přežití rostlin při extrémních teplotách.

Soukvětí se skládají z četných klásků, které vytvářejí klasy, laty nebo hrozny. Klásky jsou 1- 2 až vícekvěté, podepřené dvěma plevami (*glumae*), které se vyvinuly z podpůrných listenů. Plevy někdy chybí nebo je vyvinutá jen jedna z nich. Nad plevami se nacházejí plucha (*lemma*), t.j. podpůrný listen květu a plušky (*palea*), což jsou dva metamorfované a srostlé okvětní listy vnějšího kruhu okvětí. Pluchy jsou často ostnité. Vnitřní kruh okvětí reprezentují 2 nebo tři lodikuly (redukované okvětní lístky). Květy jsou obvykle oboupohlavní, malé (někdy jedнопohlavní - rostliny jsou potom jednodomé nebo dvoudomé), obvykle větrosnubné, značně redukované ve velikosti a počtu květních částí. Tyčinky jsou obvykle 3, nitky tyčinek jsou ohebné a 2 dílné prašníky jsou vrtivé. Semeník vrchní. Vzniká srůstem 2-3 plodolistů, ale má jen jedno pouzdro, v kterém se nachází vajíčko. Pestík se jeví jako jednotný celek a semeník nemá zpravidla ani anatomické ani morfologické znaky po srůstu plodolistů. Blizny jsou obvykle 2, vzácně je 1 blizna (rod *Nardus*) a nebo jsou blizny 3

(*Bambusa*). Plod jednosemenný nejčastěji obilka (*caryopsis*) s oplodím přirostlým k semenu, vzácně je plodem nažka, nebo bobule. Ne průřezu zrnem můžeme pozorovat vícevrstvé oplodí, tenké osemení, jednovrstvý perisperm a endosperm s vnější aleurnovou vrstvou bez škrobu a potom vnitřní vrstvu, která obsahuje v buňkách škrobová zrna a bílkovinový lepek. Na boku endospermu se nachází embryo s metamorfovaným klíčním listem a štítek (*scutellum*), který funguje jako haustorium, čerpající živiny z endospermu. Na opačné straně je krátký základ hlavního kořene, obalený koleorizou, nad kořenem je hypokotyl až po epiblast, kde přechází do mezokotylu (Mártonfi, 2006).

Rozšíření: Trávy jsou nejrozšířenější skupinou rostlin na planetě. Rostou téměř všude, od vysokých hor až po nížiny, na půdách suchých, bažinných i ve vodě, na slunci i ve stínu. Některé druhy se vyskytují pouze v určitých oblastech, jiné jsou kosmopolitní.

Trávy patří mezi zemědělsky nejdůležitější rostliny pro výživu lidí (pšenice, žito, ječmen, oves, rýže, proso, kukuřice, cukrová třtina, bambus) i hospodářských zvířat (jílek, psárka, bojínek, psineček, metlice). Obiloviny i pícniny lidé pěstují a šlechtí odedávna. Také po celé 20. století se jejich šlechtění intenzivně věnují a využívají všech poznatků genetiky. V posledních několika letech se soustřeďuje zájem také na využití některých druhů trav jako obnovitelného zdroje energie. Trávy se vyvinuly již velice dávno, prokazatelně existovaly na konci druhohor, to je před 60 - 127 miliony let. Jsou nedílnou součástí všech přirozených rostlinných společenstev a existují i společenstva, kde trávy výrazně převažují nad ostatními druhy rostlin. Je to tundra, travinná společenstva mírného pásma a tropická travinná společenstva (Opatrná, 2003).

Rostliny čeledě lipnicovité jsou lehkou rozpoznatelné mezi jinými rostlinami, jejich monofyletickost je podporovaná morfolgickými a DNA znaky. Současné molekulární studie je rozčleňují do 12 podčeledí. Mezi nimi zmíníme 5 největších, mezi které patří *Bambusoideae* - hlavně tropické rostliny, často s dřevnatějícími stébly, jejichž výška může být až 40 m (rod *Bambusa* a další). Mezi *Etrhartoideae* patří vodní a vlhkomilné byliny, mezi které patří rýže . *Oryza sativa*. *Pooideae* jsou velkou podčeledí, která zahrnuje většinu našich druhů trav. Jsou rozšířené v mírném pásmu především na severní polokouli. Všichni zástupci podčeledě *Chloridoideae* se liší stavbou klásků (rody *Eragrostis*, *Sporobolus*) mají C<sub>4</sub> fotosyntézu a vyskytují se především v polopouštních oblastech tropů, hlavně v Africe a v Austrálii. Podčeleď *Panicoideae* se liší stavbou klásků a je primárně tropickou podčeledí (např. *Panicum*, *Sorghum*, *Zea*) (Mártonfi, 2006).

## *Bambusoideae*

Obvykle vytrvalé, oddenkaté, bylinné nebo dřevnaté, s dutými nebo plnými stébly a širokými listy s pochvou a jazýčkem. květenství může být lata, klas nebo hrozen. květy jedno nebo oboupohlavní, s 1 nebo 2 plevami, někdy osinkatou pluchou a dobře vyvinutou pluškou. Lodikuly jsou obvykle 3, méně často 6 nebo více, tyčinky 2, 3, nebo 6, vzácně více. Květenství je složené z klásků. Jsou většinou oboupohlavné, klásek je jednokvětý nebo dvoukvětý, má tiž šest tyčinek, dva až tři pestíky, dvě i více plev a tři pluchy. Tato podčeď je rozdělena do dvou rodů, a nejvíce z přibližně 1 200 druhů roste v mírném a tropickém pásmu, ve vysoké nadmořské výšce, podél říčních toků a na savanách. Jejich výška dosahuje až 40 m a denní přírůstek až 1 m. (Heywood, 2007).

### **4.1.2 Morfologie**

Bambusy jsou stálezelené rostliny. Pokud dojde k úplnému zničení nadzemní části, bambusy velmi rychle regenerují. Na rozdíl od dřevin nemají bambusy kambium které umožňuje kmenu narůstat do šířky a výšky. Průměr a délka stébel zůstávají po celý život stejné.

#### 4.1.2.1 Oddenky

Bambusy se do svého okolí šíří dvěma typy oddenků.

Pachymorfní oddenky jsou krátké a tlusté, víceméně zakřiveného tvaru a jejich průměr je obvykle větší než průměr stébel, která z nich vyrůstají. Jejich články jsou asymetrické, širší než delší, plné. Kořeny vyrůstají převážně ze spodních částí kolének. Stébla vyrůstají vždy ze špičky oddenků. Postranní pupeny vytvářejí nové oddenky a tvoří tak hlavní osy růstu. Pachymorfní oddenky jsou typické pro všechny tropické druhy a horské mrazuvzdorné druhy rodu *Fargesia*. Tyto bambusy vytvářejí trsy s hustě nahloučenými stébly, které se jen pomalu šíří do okolí. Označujeme je jako trsovité bambusy.

Leptomorfní oddenky jsou dlouhé, úzké, trubkovité, jejich průměr je obvykle menší než průměr stébel, ze kterých vyrůstají. Články jsou pravidelné, zpravidla delší než širší, typicky duté. Kořeny vyrůstají po celém obvodu kolének. Na všechna kolénka obsahují pupeny a většina z nich je dormantní. Špičky těchto oddenků se horizontálně prodlužují a tvoří tak hlavní osy růstu. Z postranních pupenů vyrůstají stéble i oddenky. Leptomorfní oddenky se vyskytují u většiny druhů z mírného a subtropického pásma. Tyto bambusy

vytvářejí charakteristické háje a houštiny, kde jsou jednotlivá stébla od sebe víceméně vzdálena. Šíří se rychle do okolí a označujeme je jako výběžkaté bambusy (Rezl, 2006).

Příklady trsovitých rodů bambusů: *Chusquea*, *Fargesia*, *Kimalayacalamus*, *Phyllostachys*, *Semiarundinaria*, *Thamnocalamus*. Příklady odnožujících rodů bambusů: *Bashania*, *x Hibanobambusa*, *Indocalamus*, *Pleiblastus*, *Sasa*, *Sasaella*, *Yushania* (Ardle, 2008).

#### 4.1.2.2 Stébla

Nadzemní částí bambusů jsou silná dřevitá stébla. Kromě nosné funkce pro listy souží také jako zásobárna energie. S příchodem jara začínají rašit oddenkové pupeny a ze země vyrážejí výhonky, jejich tloušťka určuje i konečný průměr budoucích stébel. Stébla rostou velice rychle. Během 5-8 týdnů dosahují své konečné výšky. Ve stéblech se časem zvyšuje obsah křemíku, který tvrdost výrazně zvyšuje. Maximální tvrdost stébel je dosažena po skončení třetího roku.

Životnost stébel je podmíněna mnoha faktory, jako jsou klimatické podmínky, půda, druh a stáří rostliny, ale zpravidla se pohybuje mezi 5-8 lety. U mladších rostlin je životnost stébel kratší.

Stébla bambusů jsou tvořena segmentovanou strukturou článků a kolének. Články jsou zpravidla duté, ale výjimka i tady potvrzuje pravidlo: jihoamerické bambusy rodu *Chusquea* mají články plné. V průřezu jsou články kruhové, až oválné. V jedno případě, u druhu *Chimanobambusa quadrangularis*, jsou stébla čtyřhranná. Zástupci rodu *Phyllostachys* mají na článcích více nebo méně výrazný žlábek, který má často výrazné zbarvení. Kolénka jsou vždy plná, zatímco z oddenkových kolének vyrůstají kořeny, ze stébelných kolének vyrůstají větve.

Trvanlivost bambusových stébel je dána jejich vláknitou strukturou, která je složena z 50 % celulózy, zbytek tvoří lignin a křemík. Právě křemík je v nejvyšší míře obsažen na povrchu stébel. Stébla jsou nejčastěji zelená, ale některé druhy bambusů mají mimořádně atraktivní zbarvení, které kontrastuje se zelenými listy. Stébla mohou být žlutá, bronzovočervená a černá (Rezl, 2006).

#### 4.1.2.3 Větve

Schopnost tvořit větve je jednou z nejdůležitějších vlastností, která odlišuje bambusy od trav a je známkou vysoké specializace. Větve vyrůstají z pupenů na stébelnatých kolénkách a mají rovněž segmentovanou strukturu. U rodů *Phyllostachys* a *Pleioblastus* se větve vyvíjejí současně s narůstáním stébel a po jeho ukončení začnou růst listy. U druhu *Fargesia nitida* se větve tvoří až druhým rokem, takže mladá stébla jsou prvním rokem bez větví, pouze krytá pochvami. U některých rodů se větve tvoří od shora dolů, u jiných naopak. Počet větví charakterizuje rodovou příslušnost. Rod *Phyllostachys* charakterizují dvě větve, z nichž jedna je dominantní. Může se objevit třetí, málo vyvinutá. Mladé bambusy většinou větví ze všech kolének. U velkých stromovitých druhů, zvláště u dobře vyvinutých stébel, jsou větve ve spodní části zakrnělé, nebo zcela chybí (Rezl, 2006).

#### 4.1.2.4 Pochvy

Oddenky, stébla a větve jsou během svého růstu obaleny pochvami, které je chrání před vnějšími vlivy, především vlhkostí. Jakmile dojde k ukončení růstu, pochva opadají, nebo zůstávají trvale na rostlině.

Oddenkové pochvy jsou skryté pod zemí, ale jejich funkce je velmi důležitá. Špička oddenku je díky nim dokonale hladká a snadno proniká i do obtížného terénu. Jakmile oddenky ztvrdnou a narostou jim kořeny, pochvy přestanou plnit svoji funkci a rozpadnou se.

Stébelné pochvy jsou dobře patrné během prodlužování stébel. Tvarem se od sebe dost liší. V jejich horní části se mohou vyskytovat štětiny, ouška a jazýček. Tyto orgány slouží k identifikaci druhu. Pochva je zakončena čepelí.

Listové pochvy pokrývají vrcholy všech stébel a větví a jejich čepele jsou vlastními listy bambusů. V tomto případě jsou čepele podstatně větší než samotné pochvy (Rezl, 2006).

#### 4.1.2.5 Listy

Listy bambusů vyrůstají z listových pochev. Mají rozmanitý tvar i velikost. Typický tvar je protáhlý, na bázi zaoblený, na konci zašpičatělý. Největší listy, až 60 cm dlouhé a 10 cm široké má *Indocalamus tessellatus*. Naopak nejmenší listy můžeme najít mezi zástupci rodů

*Fargesia* a *Phyllostachys*. Listy některých forem jsou panašované. Listy jsou stálezelené, pouze se průběžně obnovují. Jejich životnost nepřesahuje dva roky (Rezl, 2006).

#### 4.1.2.6 Květy a semena

Bambusy kvetou poměrně vzácně, v dlouhých časových intervalech od 1 do 100 let. Kvetení bambusů bývá ukončeno úhynem rostliny, nebo jejím oslabením, po němž následuje pomalá regenerace. Mluví se o cyklickém kvetení. Jsou známy druhy, které nikdy nevykvetly, jiné zase kvetou často a pravidelně.

Květy bambusů jsou větrosnubné. Kvetené může být částečné, nebo úplné. Semena bambusů se podobají květům obilovin. Pokud chceme množit bambusy semeny výsev je vhodné provádět při 18 - 22°C nejlépe co nejdříve po sklizni semen.(Rezl, 2006; Nováková, 2004).

### 4.1.3 Popis rodu *Phyllostachys*

Tento rod zahrnuje stromové i keřovité druhy bambusů. Rozmnožují se podzemními oddenky. Stébla hladká s rýhami nad místem větvení. Postranní větve 2, vzácně s menším 3. Pochvy opadavé, blanité, jazýček obvykle nápadný, obvykle ouškatý s dlouhými osinkami, čepel obvykle ohnutá. Listová čepel s typickou žilnatinou, obvykle nesouměrná, ochlupená. Rod *Phyllostachys* pochází z Číny ale nyní jsou velmi rozšířené. Tento rod je pravděpodobně ekonomicky nejdůležitější a je využíván pro stavbu budov, výrobu papíru, podlah, nábytku, konzumaci mladých výhonků a košíkářství (Wu, 2006).

#### 4.1.3.1 *Phyllostachys aureosulcata*

Tento druh je u nás nejvíce pěstovaný. Stébla jsou vzpřímená, matně zelená se žlutými žlábkami povrch stébel je drsný. Jedna z typických vlastností tohoto druhu, stébla jsou často ve spodní části elegantně pokřivená. Tomuto jevu se říká genikulace. Pokryv listů je velmi hustý. Výhonky jsou krémově bílé s jemnými fialovými a zelenými proužky, čepel je krátká, fialová. Oddenky jsou velmi rozrůstavé. Pěstují se následující kultivary:



'Alata' - stébla celozelené, o něco vzrůstnější (5-8 m), genikulace je výraznější než u ostatních kultivarů.

'Aureocaulis' - stébla jsou citronově žlutá, kolénka bývají na slunci načervenalá. Některé listy jsou jemně panašované

'Harbin' - stébla jsou podélně rýhovaná, jejich základní zbarvení je zelené s jemnými žlutými proužky. Listy jsou menší. Kultivar je méně vzrůstný (4-6 m).

'Harbin Inversa' - žlutá stébla s jemnými zelenými proužky. Nový kultivar, který vznikl spontánní mutací *Phyllostachys aureosulcata* 'Aureocaulis'.



Obrázek 1: *Phyllostachys aureosulcata* 'Aureocaulis', zdroj: bambusy.info

'Spectabilis' žlutá stébla se zelenými žlábký, mladá stébla jsou na slunci načervenalá. Některé listy jsou jemně panašované.

Využití: všestranné, jako solitera, živý plot, hájky, kontejnery (Rezl, 2006, Crompton 2006).

#### 4.1.3.2 *Phyllostachys vivax*

Patří k nejznámějším stromovitým bambusům, které se ještě dají u nás pěstovat. Stébla jsou vzpřímená, zelená, tenkostěnná, mohou praskat pod tíhou sněhu. Větve jsou dlouhé, listy poměrně velké, elegantně převislé, vyvolávají tropický efekt. Výhonky jsou hustě pokryté tmavými skvrnami na hnědozeleném



Obrázek 2: *Phyllostachys vivax*, zdroj: bambusy.info

pozadí, čepel je zvlněná. Rozrůstá se pomalu. Protože je poměrně zimovzdorný, vyžaduje dlouhá teplá léta, intenzivní závlahu a hnojení, aby se využil jeho potenciál. Tvoří řadu krásných barevných kultivarů:

'aureocaulis' - pravděpodobně jeden z nejobdivovanějších bambusů. Stébla jsou zlatožlutá s nahodilými zelenými proužky, jakoby vytvořenými štětce. Jinak má stejné vlastnosti jako zelená forma. Občas se mohou objevit zelená stébla.

'Huanwenzhu' - spontánní stabilní mutace 'aureocaulis'. zelená stébla se žlutými žlábkami.

Využití: solitera, na chráněných místech může vytvořit mohutná stébla (Rezl, 2006).

#### 4.1.3.3 *Phyllostachys nuda*

Tento druh byl dlouho považován za nejzimovzdornější druh. Stébla jsou vzpřímená, temně zelená, ve spodní části mírně genikulovaná. Kolénka mladých stébel jsou černá s výraznými bílými kroužky. Listy jsou jemně zvlněné, středně husté. Výhonky jsou vínově hnědé s tmavými skvrnami, hlavně ve spodní části. Druhové jméno se vztahuje k tomu že na pochvách zcela chybějí ouška a štětiny, čepel je krátká, nevýrazná. Je to středně až velmi rozrůstavý druh. Pěstuje se jen jeden kultivar:



Obrázek 3: *Phyllostachys nuda*, zdroj: bambusy.info

'Localis' - ve spodní části stébel se objevují v prvním roce malé červené skvrny, někdy černají celé články. Stébla jsou mohutnější. Tato forma pochází z Číny a má vynikající vlastnosti.

Využití: hájky, houštiny, vyšší živý plot, solitera (Rezl, 2006).

## 4.2 *In-vitro* množení

Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek (Kováč, 1995).

### 4.2.1 Živná média

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, další organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin pro různé účely kultivace. Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali White, Murashige and Skoog, Gamborg et al, Gautheret, Shenk and Hildebrandt, Nitsch and Nitsch a Lloyd and McCrown. Media MS, SH a B5 jsou charakteristická vysokým obsahem makroelementů, zatímco ostatní média obsahují makroelementů podstatně méně (Kováč, 1995).

Murashige and Skoog medium (Murashige a Skoog, 1962). Složení je popsáno v příloze č 1. na straně 38.

### 4.2.2 Totipotence rostlinné buňky

U rostlin existuje schopnost přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristemického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením s následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů, resp. celých rostlin. Rostlinná buňka je totipotentní, tj. obsahuje kompletní genetickou informaci nutnou k vývoji celistvého organismu. Za určitých podmínek, které mohou být v podmínkách *in-vitro* definovány a kontrolovány, jsou morfogenetické procesy dovršeny regenerací celých rostlin.

Diferenciace rostlin *in-vitro* probíhá v různých systémech: meristémy a zygotická embrya, diferencovaná pletiva, kalus, izolované buňky a protoplasty.

Morfogeneze každého uvedeného systému má své specifické vlastnosti, které se odrážejí jak při fyziologické regulaci, tak i v genetické determinaci vývojových procesů (Novák, 1990).

### 4.2.3 Metoda kultivace jednonodálních segmentů

Nejčastěji používanou, nejjednodušší a bezpečnou metodou klonování *in-vitro* je metoda kultivace jednonodálních stonkových segmentů. Při této metodě se jako výchozí materiál používá nevětvených prýtů, tvořených několika nodálními úseky odvozených *in-vitro*. Prýt se rozřeže na jednonodové úseky, z nichž každý nese alespoň jeden axilární pupen, listy se obvykle odříznou. Axilární pupeny nodálních segmentů dávají za vhodných podmínek vznik novým prýtům, které jsou potom zakořeněny *in-vitro* nebo *in-vivo*.

Tato metoda je obtížně použitelná pro rostliny tvořící přizemní růžici, protože se velmi nesnadno odvozuje sterilní kultura. Druhy, které tvoří protáhlý stonek s listy a pupeny v jejich úžlabí se tímto způsobem množí relativně snadno. Nově vytvořené prýty jsou při této metodě opakovaně rozřezány na nodální segmenty až po dosažení žádaného počtu prýtů. Apikální část může být zakořeněna. Rychlost propagace je u této metody závislá na počtu nodů vytvořených za určitou časovou periodu.

Tato metoda představuje nejpřirozenější metodu mikropropagace. Metoda je rovněž velmi bezpečná z hlediska genetické stability regenerantů, protože není porušena integrita rostliny. Je možné říci, že tato metoda je velmi úspěšná u bylin. U dřevin vznikají často komplikace spojené s dormancí pupenů a prodlužováním prýtů (Kováč, 1995).

### 4.2.4 Materiál pro odvození explantátové kultury

Při odběru výchozího materiálu pro odvození explantátové kultury je nutné znát přesně původ matečné rostliny - o jakou varietu či kultivar se jedná. Výchozí rostlina by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách - nejlépe skleníku nebo fytotronu.

Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován obdobím roku, kdy je explantát odebírán. Změny teploty, délky dne, hladiny osvětlení, dostupnosti vody v průběhu roku ovlivňují obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlinách a mají tak vliv i na růst explantátů, z nich odebraných. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán v aktivní fázi růstu (Hradilík, 2005).

### 4.2.5 Sterilizace odebraného materiálu

Odvození sterilní primokultury je spojeno s povrchovou dezinfekcí materiálu používaného jako explantát. Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou dezinfekci pomocí jednoho nebo více dezinfekčních činidel.

Oplachování rostlin nebo jejich částí pod tekoucí vodou po dobu 30 minut až dvou hodin redukuje počet mikroorganismů přítomných na povrchu rostlin. Je doporučováno v případech, kdy se explantáty izolují z rostlin původně rostoucích v polních podmínkách nebo rostlin, které mají na svém povrchu velké množství trichomů. Redukci počtu mikroorganismů na povrchu explantátů také napomáhá jejich omytí v saponátu, následované proplachováním tekoucí vodou. Saponát také zvyšuje účinek dezinfekčních činidel, protože zvyšuje smáčivost na povrchu explantátu. Zvýšení smáčivosti povrchu explantátů pro dezinfekční činidla se také dosahuje krátkodobým ponořením explantátu do 70% etanolu.

Po opláchnutí se explantáty ponoří do dezinfekčního roztoku. Dezinfekční roztok má usmrtit mikroorganismy přítomné na povrchu explantátu a nemá poškodit vlastní explantát. Nejpoužívanějšími dezinfekčními činidly jsou chlorové vápno (zfiltrovaný 4-5% roztok), 10-15% roztok Chlornanu sodného a roztok Chloraminu B (1-5%). Z dalších používaných dezinfekčních činidel je možné jmenovat ethanol, chlornan vápenatý, dusičnan stříbrný, chlorid rtuťnatý, peroxid vodíku. Účinnost dezinfekce je možné také zvýšit přidáním několika kapek detergentu (Jar, Tween-20) do dezinfekčního roztoku. K povrchové dezinfekci se může používat buď pouze jedno dezinfekční činidlo, nebo je někdy možné zvýšit úspěšnost dezinfekce opakovanou dezinfekcí v různých dezinfekčních prostředcích.

Po dezinfekci je nutné dezinfekční roztok z explantátu dokonale odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poškozené konce explantátu se odstraní skalpelem. Explantát se poté umístí do kultivační nádoby na povrch média, popř. do média, které by mělo zajistit jeho maximální růst.

Standardní techniky používané pro desinfekci nejsou schopny eliminovat vnitřní kontaminace - přítomnost bakterií či plísní v buňkách pletiv explantátu. Pro tyto účely, a v případech neúspěšnosti klasických metod sterilizace, se používají antibiotika. Antibiotika se buď aplikují na povrch explantátu nebo se přidávají do kultivačních médií (Kováč, 1995).

Ke sterilizaci se může využívat i 0,1 - 0,3 % roztok Chloridu rtuťnatého (Ibraheem, 2013), nebo 70% roztok ethanolu na 30 s (Jain, 2003).

#### **4.2.6 Multiplikace**

Hlavním cílem je namnožení explantátů. Rostlinný materiál je opakovaně pasážován na čerstvé médium, přičemž se v závislosti na dosaženém koeficientu množení zvyšuje počet explantátů v kultuře. Tento proces množení trvá až do dosažení žádaného počtu explantátů.

Klonové množení může probíhat několika způsoby, z nichž jsou uvedeny tři - stimulace axilárního větvení, tvorba adventivních prýtů a somatická embryogeneze.

Stimulace axilárního větvení představuje nejpomalejší metodu, ale vzhledem k řadě jiných výhod ( především genetická stabilita regenerantů) je k mikroporopagaci nejčastěji využívána. U řady druhů, kde nebyla doposud realizována somatická embryogeneze či adventivní tvorba prýtů (dřeviny), je jedinou možností mikroporopagace. Jako explantátů se při této metodě využívá vzrostných vrcholů stonků nebo axilární pupeny. Explantát, který obsahuje vzrostný vrchol může v závislosti na kultivačních podmínkách dávat vznik jednomu nebo velkému počtu nových prýtů. Nově vzniklý prýt opět zahrnuje axilární pupen a úžlabní pupeny. Jeho rozřezáním na jednotlivé části je možné rostliny v explantátové kultuře dále množit. Tvorba axilárních prýtů je většinou stimulována dodáním relativně vyššího množství cytokininů do kultivačního média. Používané koncentrace cytokininů se pohybují v rozmezí 1-30 mg/l. Podstatou axilárního větvení je inhibice apikální dominance cytokininu (Kováč, 1995).

#### **4.2.7 Zakořeňování *in-vitro***

Prýty odvozené *In-vitro* mohou tvořit kořeny buď *in-vitro* nebo *in-vivo*. Zakořeňování představuje jednu z nejobtížnějších etap mikroporopagace celé řady rostlin.

V současné době se však více využívá zakořeňování *in-vivo*. Je to způsobeno především velmi vysokou cenou a pracností sterilního zakořeňování. Dalším důvodem je častá nefunkčnost kořenů vytvořených *in-vitro* po přenesení rostlin do půdy. Poškození kořenů při přenosu rostlin z explantátové kultury do půdy je možné zabránit jejich zakořeňováním v inertním porézním materiálu např. molitanu či čedičové vatě. Rostliny se ze sterilních podmínek přenáší do půdy společně s tímto materiálem.

Pouze malé množství druhů tvoří kořeny ve stádiu multiplikace na médiích s relativně vysokou koncentrací cytokininů, protože inhibuje tvorbu kořenů. K zakořeňování je nutné používat jiné kultivační médium. Tvorbu kořenů ovlivňují nejenom růstové regulátory, ale i makroelementy, mikroelementy, organické komponenty, světlo, teplota atd. U většiny druhů indukce tvorby kořenů vyžaduje navíc přítomnost auxinu. Mezi auxiny, které se používají k zakořeňování patří IAA - indol-3-acetic acid - (0,1-10 mg/l), NAA - Naphthalen acetic acid (0,05-1 mg/l) a IBA - Indol-3-butyric acid (0,5-3 mg/l). Druh a koncentrace auxinu nutného pro zakořeňování je velmi závislá na druhu rostliny (Kováč, 1995).

#### 4.2.8 Zakořeňování *in-vivo* a aklimatizace

Zakořeňováním *in-vivo* se rozumí zakořeňování prýtů odvozených *in-vitro* v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média. Jedná se o různé umělé půdy. Příkladem mohou být perlit, vermikulit, směsi obsahující písek, rašelinu, čedičová vata atd. Substrát k zakořeňování by měl být slabě kyselý až neutrální, měl by zajišťovat dostatečnou aeraci a měl by mít vysokou vodní kapacitu. Ke splnění těchto podmínek je někdy nutné používat směsi jednotlivých substrátů

Zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách se provádí tak, že se prýty jednotlivě izolují, ponoří se do roztoku auxinu a poté se zanoří do vlhkého substrátu. Prýty zakořeněné *in-vitro* se po předchozím důkladném opláchnutí zbytků živného média ulpělého na kořenech opatrně přesadí do vlhkého substrátu. Kontaminaci rostlin po jejich přenosu do nesterilních podmínek je možné zabránit aplikací fungicidů na rostliny popř. do substrátu.

V tomto stádiu je kromě dokonalého zakořenění rostlin nezbytná jejich aklimatizace na změněné podmínky zevního prostředí. Aklimatizace se především týká snížené vzdušné vlhkosti a přechodu na autotrofní způsob výživy. K aklimatizaci je nutné přistoupit až u rostlin s dostatečně vyvinutým kořenovým systémem.

K aklimatizaci na sníženou vlhkost vzduchu se rostliny uzavírají do průhledných boxů, přikrývají se fólií nebo se pěstují ve skleníku, který je vybaven zařízením s programovatelným rosením rostlin. Vlhkost vzduchu se postupně snižuje. Požadavek na postupnou aklimatizaci na nižší vlhkost vzduchu vychází z toho, že rostliny rostoucí v kultuře *in-vitro* nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají velmi často nefunkční průduchy. Tento jev se označuje vitifikace a je způsobena vysokou vzdušnou vlhkostí v kultivačních nádobách a malou intenzitou světla. Druhým problémem, se kterým musí rostliny po převedení do nesterilních podmínek vyrovnat, je přechod z heterotrofie na autotrofii.

Vzhledem k praktické nefunkčnosti listů vzniklých v explantátové kultuře je možné tyto listy považovat spíše za jakési zásobní orgány, které poskytují organické látky pro růst nových listů které již budou schopné fotosyntézy a regulace výdeje vody rostlinou (Kováč, 1995).

## 4.3 Růstové regulátory

Dříve byl růst vysvětlován převážně s procesy výživy. Od té doby se nahromadilo mnoho údajů o látkách, které regulují růstové a vývojové procesy u rostlin. Obecně je nazýváme růstové regulátory. Tento obecný název však neodlišuje látky přirozené od látek synteticky připravených. Přirozené regulátory růstu lze rozdělit do dvou skupin: rostlinné fytohormony a další látky s regulační aktivitou.

### 4.3.1 Fytohormony

Na základě určitých analogií s působením hormonů živočišných je pět skupin endogenních růstových regulátorů považováno za rostlinné hormony. Jsou to auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, etylen. Mimo ně existuje v rostlinách množství látek s růstově regulační aktivitou, které mezi hormony řazeny nejsou, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Jsou to zejména brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek (Procházka a kol., 1998).

Některé fytohormony jsou přírodní (IAA, zeatin), ostatní se vyrábějí synteticky (Thorpe, 1981).

#### 4.3.1.1 Auxiny

Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především k stimulaci růstu kalusu a buněk, k indukci tvorby adventivních kořenů, k indukci somatické embryogeneze a k stimulaci růstu apikálních meristémů.

Účinnost auxinů je závislá na typu explantátu, růstových podmínkách a použitém auxinu. Uvádí se, že 2,4-D (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid) je 8-12 x účinnější než IAA, 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) je 5x účinnější než IAA, NAA je 2-4x účinnější než IAA.

Obvyklé množství auxinů v médiu je 0,1-20 mg/l (Hradilík, 2005).

#### 4.3.1.2 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony výrazně podporující buněčné dělení, indukují aktivitu meristémů a tvorbu pupenů. Výrazně snižují apikální dominanci a podporují růst



axilárních pupenů (stimulace větvení). Cytokininů inhibují zakládání adventivních kořenů a jejich přítomnost v médiu často brání tvorbě kořenů.

Do skupiny cytokininů patří: benzylaminopurin (BAP), isopentenyladenin (2iP), Furfurylaminopurin (kinetin), zeatin. Do této skupiny patří také adenin, který sice nevykazuje fytohormonální aktivitu ale zvyšuje účinnost cytokininů (Hradilík, 2005).

#### 4.3.1.3 Gibeleriny

Většina explantátů gibelerin pro svůj růst nevyžaduje, ale v některých případech lze aplikací giberelinu stimulovat růst explantátu, případně rušit endogenní dormanci (Hradilík, 2005).

#### 4.3.1.4 Kyselina abscisová

Abscisová kyselina je do živných médií přidávána jen výjimečně pro indukci somatických embryí, stimulaci tuberizace, květní indukce, navození dormance nebo zbrzdění růstu explantátu (Hradilík, 2005).

### 4.4 Množení rodu *Phyllostachys* v podmínkách *in-vitro*

#### 4.4.1 Sterilizace

Sterilizace u rodu *Phyllostachys* je možná několika způsoby. Komatsu (2011) provádí sterilizaci Chlornan sodný (NaOCl) v koncentraci 1,41 % po dobu deseti minut. ChenZuoHan (2008) využívá 0,25% roztok Chlornanu sodného. Sharma (2011) uvádí sterilizaci 70% roztokem ethanolu a poté 0,1% HgCl<sub>2</sub> (Chlorid rtuťaný) po dobu pěti minut. Mishra (2008) uvádí sterilizaci také 70% roztokem ethanolu a poté 0,05 - 0,2% roztokem HgCl<sub>2</sub> po dobu deseti minut. Koncentraci roztoku mění podle ročního období, kdy v létě používá vyšší koncentraci 0,2 % kvůli deštivějšímu počasí. Ndiaye (2006) používá 0,1% roztok HgCl<sub>2</sub> po dobu dvaceti minut.

#### 4.4.2 Multiplikace

Sharma (2011) využívá pro multiplikaci MS medium a regulátory BA (koncentrace 0,25 - 1,5 mg l<sup>-1</sup>), IBA, IAA, NAA a kinetin (koncentrace 0,25 - 2 mg l<sup>-1</sup>). Explantáty udržuje při teplotě 25°C a denním rytmu 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Mishra (2008) uvádí použití IAA, BA a

BAP. Ndiaye (2006) využívá BAP 0,5, 1, 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, kinetin 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Bag (2000) využívá k multiplikaci BAP a IBA. U kinetinu zjišťuje, že jeho přítomnost nemá vliv na růst explantátů

#### 4.4.3 Zakořeňování

Sharma (2011) testuje různé koncentrace NAA (0,25 - 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) přitom počet kořenů a jejich délka se zvyšuje s množstvím použitého NAA. Při množství 4 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> je procento zakořeňování u druhu *Bambusa balcoa* 90%. Mishra (2008) používá IBA a Coumarin v různých koncentracích. Ndiaye (2006) využívá MMS medium s různými koncentracemi NAA a IBA (5 - 20 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) a BAP (0,1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>). Zjišťuje že explantáty odebrané z dospělých rostlin nekoření při nízké koncentraci IBA (5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>), ale až při vysokých koncentracích IBA (20 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) s 45% úspěšností u *Bambusa vulgaris*. Ramanayake (1997) používá 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA. při této metodě koření 77 % explantátů *Dendrocalamus giganteus*.

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Příprava materiálu a jeho zpracování

#### 5.1.1 Rostlinný materiál - odběr primárních explantátů

K provedení pokusu *in-vitro* množení byly pořízeny tři kontejnerované rostliny rodu *Phyllostachys*. *Phyllostachys vivax*, *Phyllostachys nuda* a *Phyllostachys auteosulcata* 'Aureocaulis'. Rostliny byly přesazeny do kontejnerů objemu 5l, zbaveny škůdců a umístěny do skleníku České zemědělské univerzity 3 měsíce před prvním odběrem primárních explantátů. Rostliny byly přihnojeny NPK (N - dusík 15%, P - fosfor 15%, K - draslík 15%).

Primární explantáty v podobě nodálních segmentů (vrcholové i stonkové) o velikosti 2 cm byly odebrány v lednu roku 2014 a následně pak dle potřeby.

K provedení jedné varianty bylo z každé rostliny odebíráno kolem 60 segmentů. Segmenty byly na dobu k přenesení do laboratoře a následné sterilizaci uchovávány v čisté vodě v uzavřené skleněné nádobě.

### **5.1.2 Živná média, jejich příprava a složení**

Jako základní médium pro mikropropagaci bylo použito MS medium (Murashige a Shoog, 1962). Jedná se o nejpoužívanější médium. Vlastní složení média je uvedeno v tabulce č.1. na straně 33. Pro multiplikační médium byla použita plná MS s přidavkem fytohormonů o koncentracích BAP (0,5 - 5 mg.l<sup>-1</sup>), TDZ (1 - 2 mg.l<sup>-1</sup>) a IAA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Do zakořeňovacích médií byla použita adice o koncentracích NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>), IBA (10 - 20 mg.l<sup>-1</sup>), COUMARIN (40 - 80 mg.l<sup>-1</sup>) a IAA (5 mg.l<sup>-1</sup>).

Základní MS médium bylo nejčastěji připravováno v množství jednoho nebo půl litru. Podle tabulky byly přidány makroelementy. Množství větší než 10 ml pomocí odměrného válce, množství menší než 10 ml automatickou pipetou s možností nastavení požadovaného objemu. Látky v pevném stavu (sacharóza, agar, myoinositol) byly naváženy pomocí analytických vah. Požadované množství bylo doplněno destilovanou vodou. Poté se pomocí měřiče pH stanovilo vhodné pH v rozmezí 5,6 - 5,8. Nevhodné pH se reguluje pomocí KOH (Hydroxid draselný) nebo pomocí kyseliny citronové.

Médium bylo po optimalizování pH vloženo do mikrovlnné trouby a přivedeno k varu. Správné rozvaření média nastává po úplném zhomogenizování obsahu.

Růst rostlin v živných médiích se dá regulovat přidáním různých fytohormonů. všechny použité varianty pro multiplikaci nebo zakořeňování jsou uvedeny v tabulce č. 2 na straně 39.

### **5.1.3 Sterilizace média**

Sterilizace média proběhla v autoklávu, ve kterém se proces sterilizace provádí vlhkým teplým vzduchem při zvýšeném tlaku 101,5 kPa. Teplota je 121 °C. Sterilizace probíhá 20 minut.

### **5.1.4 Příprava materiálu, sterilizace explantátů**

Ve skleníku byly odebrány nodální segmenty a odstraněny veškeré pochyvy nebo suchá pletiva, které by mohly být zdrojem kontaminace. Poté byly 10 minut proplachovány čistou vodou pro odstranění nečistot. Do čisté nádoby se připravil roztok destilované vody, chlornanu sodného vodného (koncentrace 0,47 %, 0,94 % a 1,41 %) a několika kapek jaru pro lepší smáčenlivost. Do této nádoby se segmenty umístily na 10 až 30 min. Po určeném čase se sterilním prostředím flowboxu byla z nádoby odlita voda a nádoba byla opět naplněna

sterilní vodou. Nodální segmenty zůstaly v nádobě. Vylití vody a opětovné naplnění sterilní destilovanou vodou se dohromady opakovalo třikrát po 15 min. Poté se nodální segmenty přemístily do kultivačního média a dále kultivovány.

## **5.2 Kultivace materiálu**

Kultivace sterilního materiálu probíhá ve sterilním prostředí flowboxu. Z nodálních segmentů se skalpelem odřízne poškozená tkáň sterilizací a segment se vloží do Erlenmayerovy baňky pinzetou. Do jedné baňky jsou umístěny tři segmenty. Poté je hrdlo baňky uzavřeno alobalem a obaleno polyetylenovou folií. Při kultivaci je nutné dát nejvyšší opatrnosti aby nedošlo ke kontaminaci.

### **5.2.1 Kultivace v kultivační místnosti**

Baňky s nodálními segmenty se umístí do kultivační místnosti. Teplota v pěstební místnosti je 25 - 30 °C. Světelný cyklus je 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Část vzorků bylo umístěno v laboratoři v řízené atmosféře, kde byla udržována stálá teplota 23 °C a světelný cyklus 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Po pěti až sedmi dnech se projeví kontaminace média. Tyto baňky je nutné odstranit. Baňky se v kultivační místnosti kultivují 4 až 5 týdnů a poté se provádí vyhodnocení počtu a délky výhonů. Po vyhodnocení se výhony přepasážují do zakořeňovacího média.

### **5.2.2 Pasážování**

Po 4 až 5 týdnech se narostlé rostliny přepasážují do zakořeňovacího média. Pasážování probíhá ve flowboxu za sterilních podmínek. Erlenmayerovy baňky s rostlinami se očistí lihem nebo dezinfekčním přípravkem a rostliny se pinzetou vyjmou, rozřezají na jednotlivé segmenty a přenesou do Erlenmayerových baňek se zakořeňovacím médiem. Baňky jsou poté přeneseny do kultivační místnosti.

### **5.2.3 Kultivace v zakořeňovacím médiu**

Baňky s nodálními segmenty se umístí do kultivační místnosti. Teplota v pěstební místnosti je 25 - 30 °C. Světelný cyklus je 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Část vzorků bylo umístěno v laboratoři v řízené atmosféře, kde byla udržována stálá teplota 23 °C a světelný cyklus 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Po 4 až 5 týdnech probíhá zpracování výsledků.

### **5.3 Statistické zpracování dat**

Statistické zpracování dat bylo prováděno v programu STATISTICA12 Pro vyhodnocení dat byla zvolena jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) při hladině významnosti  $p=0,05$ . Pro detailnější vyhodnocení byl použit Duncanův test.

## 6 Výsledky

### 6.1 Vyhodnocení metod sterilizace

Pro sterilizaci byl zvolen zředěný roztok chlornanu sodného, který patří mezi nejpoužívanější a poměrně laciné chemikálie používané ke sterilizaci rostlinných materiálů. Testovány byly tři koncentrace (0,47 %, 0,94 %, 1,41 %) používané různou dobu (10, 20, 30 minut).

Procentuelně největší intenzitu regenerace explantátů měla nejmenší koncentrace (0,47 %) po dobu deseti nebo dvaceti minut. U větších koncentrací se projevilo poškození buněk, hnědnutí explantátů a nízké procento regenerace explantátů.

Z hlediska procenta kontaminace se statisticky odlišuje varianta s3 (NaCl 0,47 %, 20 minut), která patří do skupiny a. Varianta s3 se statisticky liší od varianty s7 (NaCl 1,41 %, 30 minut), která patří do skupiny b. Z toho je zřejmé že z hlediska kontaminace je varianta s3 prokazatelně lepší.

Při porovnání procenta kontaminace vyplývá že doba máčení v NaCl nemá tak velký vliv na kontaminaci. Velký vliv má spíše koncentrace NaCl.

Detailní výsledky Anova testu jsou umístěny v příloze na straně 41.

Varianty	Koncentrace chlornanu sodného (%)	Doba máčení v NaClO (minuty)	Výchozí počet explantátů	Kontaminace (počet explantátů)	Úspěšnost regenerace explantátů (%)
s1	0,47	10	30	6	71
s2	0,94	10	30	5	68
s3	0,47	20	24	8	75
s4	0,94	20	30	6	60
s5	0,94	30	30	4	61
s6	0,47	30	24	5	50
s7	1,41	30	30	2	11
s8	1,41	20	21	3	17

Tabulka č. 1: Metody sterilizace, kontaminace a procento regenerace

Varianty	Vyhodnocení metod sterilizace	
	Výchozí počet explantátů	Sterilní (%)
s1	30	80 ± 0,40 a, b
s2	30	83 ± 0,37 a, b
s3	24	66 ± 0,48 a
s4	31	80 ± 0,40 a, b
s5	30	86 ± 0,34 a, b
s6	25	80 ± 0,40 a, b
s7	30	93 ± 0,25 b
s8	21	85 ± 0,35 a. b

Tabulka č. 2: Statistické vyhodnocení metod sterilizace. Procento nezkontaminovaných a směrodatná odchylka, ( $\pm$  značí směrodatnou odchylku), Duncanův test

Varianty	Vyhodnocení metod sterilizace	
	Výchozí počet explantátů	Úspěšnost regenerace explantátů (%)
s1	24	70 ± 0,46 a
s2	25	68 ± 0,47 a
s3	16	75 ± 0,44 a
s4	25	60 ± 0,50 a
s5	26	61 ± 0,49 a
s6	20	50 ± 0,51 a
s7	28	10 ± 0,31 b
s8	18	16 ± 0,38 b

Tabulka č. 3: Statistické vyhodnocení regenerace u použitých metod. Počet regenerovaných a směrodatná odchylka ( $\pm$  značí směrodatnou odchylku), Duncanův test

## 6.2 Vyhodnocení multiplikačních médií

Podle vědeckých článků bylo zvoleno 12 různých variant. Cílem bylo najít medium, které by zajišťovalo co největší multiplikaci explantátů. U některých variant se testoval i účinek přidání PVP do média.

Z použitých metod multiplikace středně vysoké hodnoty vykazovaly v průměrném počtu výhonů varianty s plným MS médiem TDZ 1 - 2 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) a TDZ 1 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) s IAA 0,5 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ). Nejvyšší hodnoty vykazovala varianta m11 s obsahem BAP 5 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) s PVP 1 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).

Z hlediska průměrného počtu výhonů se statisticky odlišují: varianta m1, která patří do skupiny a, varianta m6, která patří do skupiny b a varianta m11, která patří do skupiny c. Proto variantu m11 (s obsahem BAP 5 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) s PVP 1 ( $\text{mg.l}^{-1}$ )) považujeme ze optimální, s největším množitelenským potenciálem.

V průměrné délce výhonů vykazovaly střední hodnoty varianty s TDZ 1 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ), nejvyšší hodnoty měly varianty s BAP 0,5 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ), TDZ 2 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) a MS + PVP 1 ( $\text{mg.l}^{-1}$ ). Detailní výsledky Anova testu jsou umístěny v příloze na straně 43.

Varianta	Medium	Přidané regulátory	Množství ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	Počet explantátů	Průměrný počet výhonů, ( $\pm$ směrodatná odchylka),	Průměrná délka výhonů (cm), ( $\pm$ směrodatná odchylka),
m1	MS	BAP	1,0	64	0,22 $\pm$ 0,43 a	0,46 $\pm$ 1 b
m2	MS	BAP	0,5	72	0,58 $\pm$ 0,73 a, b	1,79 $\pm$ 2,18c, d
m3	MS	BAP + IAA	1,0 + 0,5	12	0,25 $\pm$ 0,45 a	0,75 $\pm$ 1,54 a, b
<b>m4</b>	<b>MS</b>	<b>TDZ</b>	<b>1,0</b>	<b>98</b>	<b>1,13 <math>\pm</math> 1,54 a, b</b>	<b>1,98 <math>\pm</math> 2,15 a, b, c</b>
m5	MS	TDZ + IAA	1,0+ 0,5	36	1 $\pm$ 1,67 a, b	1,53 $\pm$ 1,61a, c
<b>m6</b>	<b>MS</b>	<b>TDZ</b>	<b>2,0</b>	<b>41</b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 1,49 b</b>	<b>2,51 <math>\pm</math> 2,05 d</b>
m7	MS	-	-	22	0,7 $\pm$ 0,57 a, b	1,75 $\pm$ 1,68 c, d
m8	MS+PVP	TDZ	1,0+1,0	60	0,95 $\pm$ 1,2 a, b	1,13 $\pm$ 1,24 a, b, c
m9	MS + PVP	TDZ + IAA	1,0+0,50+1,0	33	0,36 $\pm$ 0,49 a, b	0,79 $\pm$ 1,11 a, b
m10	MS + PVP	BAP	1,0+1,0	16	0,38 $\pm$ 0,62 a	0,81 $\pm$ 1,54 a, b
<b>m11</b>	<b>MS + PVP</b>	<b>BAP</b>	<b>5,0+1,0</b>	<b>54</b>	<b>2,18 <math>\pm</math> 3,52 c</b>	<b>1,41 <math>\pm</math> 1,33 a, c</b>
m12	MS + PVP	-	1,0	29	0,86 $\pm$ 0,35 a, b	2,10 $\pm$ 2,6 c, d

Tabulka č. 4: Varianty multiplikačních médií



### 6.3 Vyhodnocení zakořeňovacích médií

K zakořeňování *in-vitro* byly použity regulátory NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>), IBA (10 - 20 mg.l<sup>-1</sup>), Coumarin (40 - 80 mg.l<sup>-1</sup>), IAA (5 mg.l<sup>-1</sup>) a NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>). Část prýtů bylo převedeno *ex-vivo* do pěstebního substrátu. Žádná z těchto osmi variant však nevedla k docílení zakořenění.

## 7 Diskuze

Cílem této práce bylo testování vlivu různých metod při kultivování rostlin rodu *Phyllostachys* (*Phyllostachys aureosulcata*, *Phyllostachys nuda*, *Phyllostachys vivax*). Tento rod bambusů je velmi tržně zajímavý pro pěstování v českých přírodních podmínkách. Rezl (2006) považuje tento rod za nejzajímavější pro využití v mírném pásmu. Druhy *Phyllostachys aureosulcata*, *Phyllostachys nuda* jsem zvolila protože jsou považovány za jedny z nejzimovzdornějších druhů z rodu *Phyllostachys* a navíc *Phyllostachys aureosulcata* je velmi populární díky mnohým kultivarům a jejich netradičnímu zbarvení. Druh *Phyllostachys vivax* jsem zvolila protože se domnívám že patří mezi druhy s velkým potenciálem. Je to bambus s nejmohutnějšími stébly který jde u nás pěstovat i když zimovzdornost není tak dobrá.

Při sterilizaci odebraného materiálu byly použity různé koncentrace chlornanu sodného (0,47 %, 0,94 %, 1,41 %) působící různou dobu ( 10, 20, 30 minut). Komatsu (2011) provádí sterilizaci u druhu *Phyllostachys bambusoides* chlornanem sodným (NaOCl) v koncentraci 30 % po dobu deseti minut, zatímco ChenZuoHan (2008) využívá 0,25% roztok Chlornanu sodného. Výsledky mojí práce ukazují, že již koncentrace 1,41 % snižuje u nodálních segmentů procento regenerace, 0,47 % koncentrace chlornanu sodného má 70% regeneraci, i když množství kontaminovaných rostlin bylo o 5 - 13 % více než při variantě v nejvyšší koncentraci.

Bag (2000) využil ke stimulaci růstu fytohormon BAP v kombinaci s IBA. Testoval nízké i vysoké koncentrace BAP samostatně nebo s přidáním IBA. Jeho výsledky dokazují že se zvyšující koncentrací BAP stoupal také počet výhonů, i když jejich délka se zmenšovala. Výsledky mojí práce potvrzují jeho testy. BAP 5(mg.l<sup>-1</sup>) má výrazně lepší výsledky než jeho menší koncentrace. Domnívám se, že při testování vyšších koncentrací by byly výsledky mojí práce shodné s jeho. Já jsem k testování využila nejvyšší koncentraci BAP 5(mg.l<sup>-1</sup>).

ChenZuoHan (2008) používá TDZ v koncentracích 0.001-0.1 mg.l<sup>-1</sup> v kombinaci s ostatními fytohormony. V experimentu jsem využila TDZ samostatně v koncentracích 1 - 2 mg.l<sup>-1</sup>. Výsledky s TDZ 2 mg.l<sup>-1</sup> patřily mezi nejúspěšnější. Z dosažených výsledků lze posoudit,

že BAP  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  a TDZ  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  se nejvíce osvědčily u rodu *Phyllostachys*. TDZ se moc nepoužívá, myslím že má potenciál.

Dalším cílem práce bylo stanovení vhodného media pro zakořenění rostlin *in-vitro*. Sharma (2011) množil *in-vitro* bambus *Bambusa balcoa*. Testoval NAA v různých koncentracích od 0 -  $4 \text{ mg.l}^{-1}$ . Do koncentrace  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  explantáty nekořenily, od vyšších koncentrací se množství a délka stále zvyšovala. Ve svém pokusu jsem mimo jiné testovala NAA v koncentraci  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Bohužel ani tato vyšší koncentrace než u Sharmy nespustila u explantátů tvorbu kořenů. Mishra (2008) u druhu *Bambusa tulda* testuje různé koncentrace IBA a Coumarinu a podaří se mu spustit tvorbu kořenů u všech variant. V mém pokusu jsem testovala IBA ( $10 - 20 \text{ mg.l}^{-1}$ ), COUMARIN ( $40 - 80 \text{ mg.l}^{-1}$ ). U žádné ze zmíněných variant se nepodařilo spustit kořenění.

## 8 Závěr

Hlavním cílem práce byla optimalizace mikropropagace vybraných druhů rodu *Phyllostachys* v kulturách *in-vitro*. Jedním z cílů bylo testování účinnosti sterilizace. Testován byl Chlornan sodný ve 3 různých koncentracích působící různou dobu. Statisticky nejlepších výsledků v poměru kontaminace a následné regenerace dosahoval chlornan sodný v koncentraci 0,47 % působící po dobu 10 minut a po dobu 20 minut.

Testováno bylo 12 variant multiplikačních médií s BAP (0,5 - 5 mg.l<sup>-1</sup>), TDZ (1 -2 mg.l<sup>-1</sup>) a IAA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Ze statistické analýzy vychází, že u druhů rodu *Phyllostachys* (*Phyllostachys aureosulcata*, *Phyllostachys nuda*, *Phyllostachys vivax*) středních výsledků multiplikace dosahovala plná MS média s přidavkem fytohormonů varianty TDZ 1 (mg.l<sup>-1</sup>) a TDZ 1 (mg.l<sup>-1</sup>) s IAA 0,5 (mg.l<sup>-1</sup>). Nejlepších výsledků dosahovaly varianty s koncentrací BAP 5 (mg.l<sup>-1</sup>) a TDZ 2 (mg.l<sup>-1</sup>). Několik explantátů vytvořilo až 10 - 15 výhonů což zvyšuje množitelství potenciál.

Různé varianty složení zakořeňovacích médií se ukázaly být nedostatečné, protože se ani v jedné variantě nepodařilo iniciovat tvorbu kořenů. Byla zvolena média, která podle vědeckých článků měla úspěšnost zakořenění u podčeledi *Bambusoideae* až 90% úspěšnost.

K zakořeňování *in-vitro* byly použity regulátory NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>), IBA (10 - 20 mg.l<sup>-1</sup>), Coumarin (40 - 80 mg.l<sup>-1</sup>), IAA (5 mg.l<sup>-1</sup>) a NAA (5 mg.l<sup>-1</sup>). Část prýtů bylo převedeno *ex-vivo* do pěstebního substrátu. Žádná z těchto osmi variant však nevedla k docílení zakořenění.

Pro dosažení dalších výsledků by bylo vhodné pokračovat v experimentu a otestovat další fytohormony a jejich koncentrace.

## 9 Seznam literatury

- Ardle, J. 2008. Bambusy a trávy. Knižní klub. Praha. 160 s. ISBN: 978-80-242-2041-3
- Bag, N. Chandra, S. Palni \*, L. M. S. Nandi S. K. 2000. Micropropagation of Dev-ringal [Thamnocalamus spathiflorus (Trin.) Munro] — a temperate bamboo, and comparison between in vitro propagated plants and seedlings. Plant Science 156 (2000) p. 125–135
- Crompton, D. 2006. Ornamental Bamboos. Timber Press. Oregon. 306s.. ISBN: 978-0881927900
- ChenZuoHan. 2008. Studies on Micropropagation in Vitro of Phyllostachys Pubescens Embryo. Master's thesis. Zhejiang Forestry College. Forest cultivation. 48s.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O. 2007. Flowering plant families of the world. Kew Publishing. Kew. p. 424. ISBN: 978 1 84246 165 5
- Hradilík, J. 2005. Rostlinné explantáty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 85 s. ISBN: 80-7157-915-7
- Ibraheem, Y. 2013. In vitro regeneration systems for economically important date palm (Phoenix dactylifera L.) cultivars. Verlag Dr. Köster. Berlin. 184 p. ISBN 978-3-89574-831-8
- Jain, S. M., Ishii, K. 2003. Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer academic publishers. Dodrecht. 840 p. ISBN 1-4020-1135-0
- Komatsu, H.K. Batagin-Piotto, K. D. Brondani, G. E. Gonçalves, A. N. Almeida, M. 2011. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. Journal of Forestry Research. June 2011, Volume 22, Issue 2, p. 209-215
- Kováč, J. 1995. Explantátové kultury rostlin. Vydavatelství Univerzity Palackého. Olomouc. 140 s. ISBN: 80-7067-493-8
- Kováč, J. 1992. Explantátové kultury rostlin. Univerzita J. E. Purkyně. Ústí nad Labem. 145s. ISBN: 80-7044-036-8
- Mártonfi, P. 2006. Systematika cievnatých rastlín. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Košice. 220 s. ISBN: 80-7097-628-4

- Murashige T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Mishra, Yogeshwar; Patel, Pradeep-Kumar; Yadav, Suman; Shirin, Fatima; Ansari, S. A., 2008: A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam) 115(3): 315-318
- Novák, F. J. 1990. Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia. Praha. 208 s. ISBN: 80-200-0344-4
- Nováková, A. 2004. Okrasné trávy. Grada publishing a. s. Praha. 116 s. ISBN: 80-247-0820-5
- NDIAYE, A. DIALLO, M. S. NIANG, D. GASSAMA-DIA, Y. K. 2006. In vitro regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (13), pp. 1245-1248
- Opatrná, M. 2003. Pěstujeme okrasné trávy. Brázda. Praha. 175 s. ISBN: 80-209-0318-6
- Procházka, S. et. al. 1998. Fyziologie rostlin. Academia. Praha. 484 s. ISBN 80-200-0586-2
- Rezl, P. 2006. Bambusy a jejich pěstování u nás. Grada. Praha. 96 s. ISBN: 80-247-1528-7
- Ramanayake, S. M. S. D, Yakandawala, K. 1997. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Science*. 11/1997. p. 213–223
- Saxena, S. 1990. In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.). *Plant cell reports* (1990) 9. 431 - 434s.
- Sharma, P. Sarma, K. P. 2011. In vitro propagation of *Bambusa balcooa* for a better environment. *International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences*. Bangkok. 252s.
- Thorpe, A. T. 1981. *Plant tissue culture : methods and applications in agriculture*. Academic Press. New york. 379 p. ISBN: 0126906807
- Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong. 2006. *Flora of China. Vol. 22 (Poaceae)*. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

## 10 Seznam použitých zkratek

BAP - benzylaminopurin

TDZ - thidiazuron

IAA - indole -3- acetic acid

NAA - Naphthalene acetic acid

IBA - Indole-3-butyric acid

2,4-D - 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid

2,4,5-T - 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid

MS - Murashige a Shoog

PVP - Polyvinylpyrollidon

BA - benzyladenin

## 11 Samostatné přílohy

MS			
		koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	Množství zásobního roztoku na 1l [ml]
<b>Makroelementy</b>	KNO <sub>3</sub>	1900,00	100,00
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	100,00
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440,00	50,00
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370,00	50,00
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	50,00
	Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,30	50,00
	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,80	
<b>Mikroelementy</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	1,00
	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,30	1,00
	ZnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	8,60	1,00
	KI	0,80	1,00
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,00
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,02	0,10
	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,02	0,10
<b>Vitamíny</b>	Thiamine HCl	1,00	1,00
	Nicotinic acid	0,50	1,00
	Pyridoxine HCl	0,50	1,00
	Myo- Inositol	100	
<b>Ostatní</b>	Casein	200	
	Glutamin	200	
	Sacharoza	30000	
	Agar	7000	

Tabulka č. 5: složení MS media



Varianta	Medium	Přidané regulátory	množství (mg.l-1)	typ média
m1	MS	BAP	1	multiplikační
m2	MS	BAP	0,5	multiplikační
m3	MS	BAP + IAA	1 + 0,5	multiplikační
m4	MS	TDZ	1	multiplikační
m5	MS	TDZ + IAA	1+ 0,5	multiplikační
m6	MS	TDZ	2	multiplikační
m8	MS	-	-	multiplikační
m9	MS	TDZ + PVP	1+1	multiplikační
m10	MS	TDZ +IAA + PVP	1+0,50+1	multiplikační
m11	MS	BAP + PVP	1+1	multiplikační
m12	MS	BAP + PVP	5+1	multiplikační
m13	MS	PVP	1	multiplikační
z1	MS	BAP	1	zakořeňovací
z2	MS	NAA	5	zakořeňovací
z3	MS	IBA	10	zakořeňovací
z4	MS	IBA	20	zakořeňovací
z5	MS	COUMARIN	40	zakořeňovací
z6	MS	COUMARIN	80	zakořeňovací
z7	MS	IAA	5	zakořeňovací

Tabulka č. 6: použité varianty růstových regulátorů

Varianta	Koncentrace chlornanu sodného	Doba louhování
s1	10%	10 minut
s2	20%	10 minut
s3	10%	20 minut
s4	20%	20 minut
s5	20%	30 minut
s6	10%	30 minut
s7	30%	30 minut
s8	30%	20 minut

Tabulka č. 7: varianty sterilizace materiálu

Varianty	Vyhodnocení metod sterilizace		
	Sterilní (%)	a	b
s1	80 ± 0,40	****	****
s2	83 ± 0,37	****	****
s3	66 ± 0,48	****	
s4	80 ± 0,40	****	****
s5	86 ± 0,34	****	****
s6	80 ± 0,40	****	****
s7	93 ± 0,25		****
s8	85 ± 0,35	****	****

Tabulka č. 8: Vyhodnocení analýzy rozptylu u metod sterilizace ( $\pm$  značí směrodatnou odchylku), Duncanův test

Varianty	Statistické vyhodnocení regenerace		
	Úspěšnost regenerace explantátů (%)	a	b
s1	70 ± 0,46	****	
s2	68 ± 0,47	****	
s3	75 ± 0,44	****	
s4	60 ± 0,50	****	
s5	61 ± 0,49	****	
s6	50 ± 0,51	****	
s7	10 ± 0,31		****
s8	16 ± 0,38		****

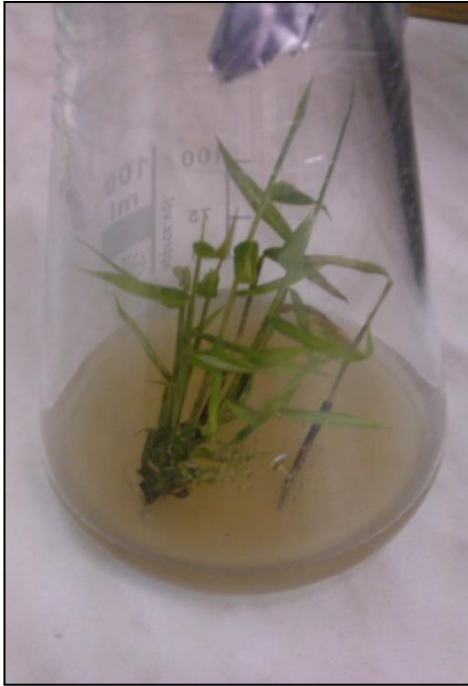
Tabulka č. 9: Vyhodnocení analýzy rozptylu u regenerace explantátů ( $\pm$  značí směrodatnou odchylku), Duncanův test

Varianty	Multiplikace:Vyhodnocení počtu výhonů				
	Regulátory	Průměrný počet výhonů	a	b	c
m1	TDZ 1	0,81	****	****	
m2	BAP 1	0,22	****		
m3	MS + PVP	0,80	****	****	
m4	BAP 5 + PVP	2,19			****
m5	TDZ 1 + PVP	0,95	****	****	
m6	TDZ 1 + IAA 0,5 + PVP	0,36	****		
m7	BAP 0,5	0,58	****	****	
m8	BAP 1 + IAA 0,5	0,25	****		
m9	TDZ 1 + IAA 0,5	1,00	****	****	
m10	TDZ 2	1,20		****	
m11	BAP 1 + PVP	0,38	****		

Tabulka č. 10: Multiplikace:Statistické vyhodnocení počtu výhonů (Anova, Duncanův test)

Varianty	Multiplikace:Vyhodnocení délky výhonů					
	Regulátory	Průměrná délka výhonů	a	b	c	d
m1	TDZ 1	1,34	****	****	****	
m2	BAP 1	0,46		****		
m3	MS + PVP	1,96			****	****
m4	BAP 5 + PVP	1,41	****		****	
m5	TDZ 1 + PVP	1,13	****	****	****	
m6	TDZ 1 + IAA 0,5 + PVP	0,79	****	****		
m7	BAP 0,5	1,78			****	****
m8	BAP 1 + IAA 0,5	0,75	****	****		
m9	TDZ 1 + IAA 0,5	1,53	****		****	
m10	TDZ 2	2,51				****
m11	BAP 1 + PVP	0,81	****	****		

Tabulka č. 11: Multiplikace:Statistické vyhodnocení délky výhonů (Anova, Duncanův test)



Obrázek 5: TDZ 2 po čtyřech týdnech



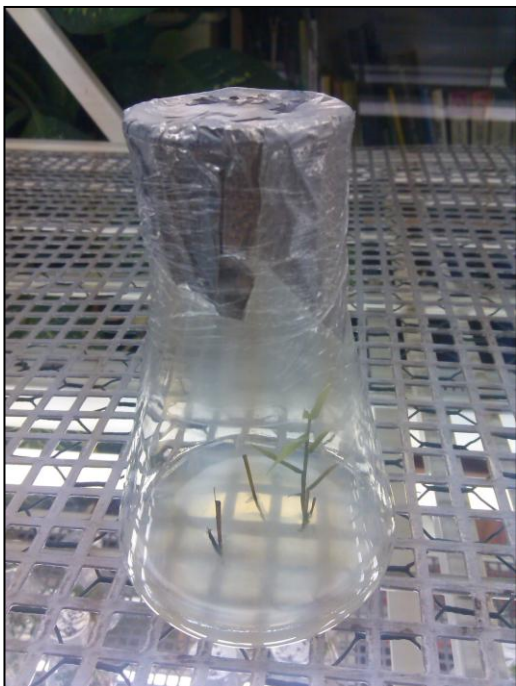
Obrázek 4: BAP 5 + PVP 1 po čtyřech týdnech



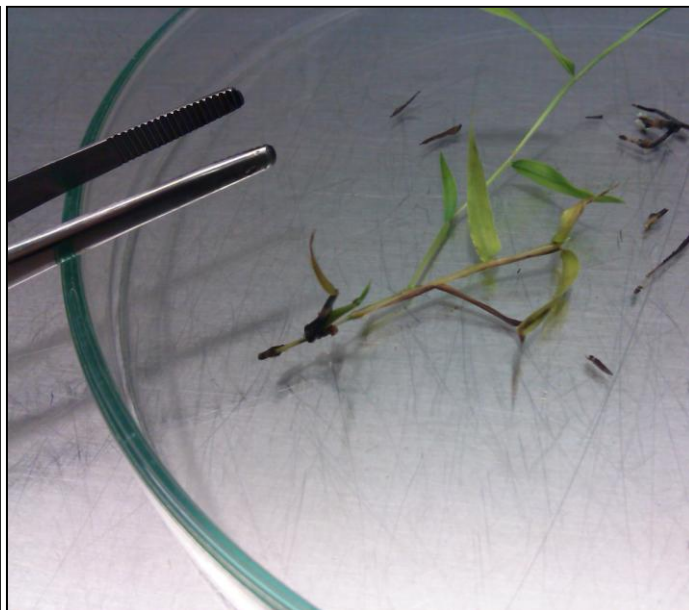
Obrázek 6: TDZ 1 po čtyřech týdnech



Obrázek 7: BAP 0,5 po čtyřech týdnech



Obrázek 9: BAP 1 po čtyřech týdnech



Obrázek 8: Explantát připravený k převodu do zakořeňovacího media



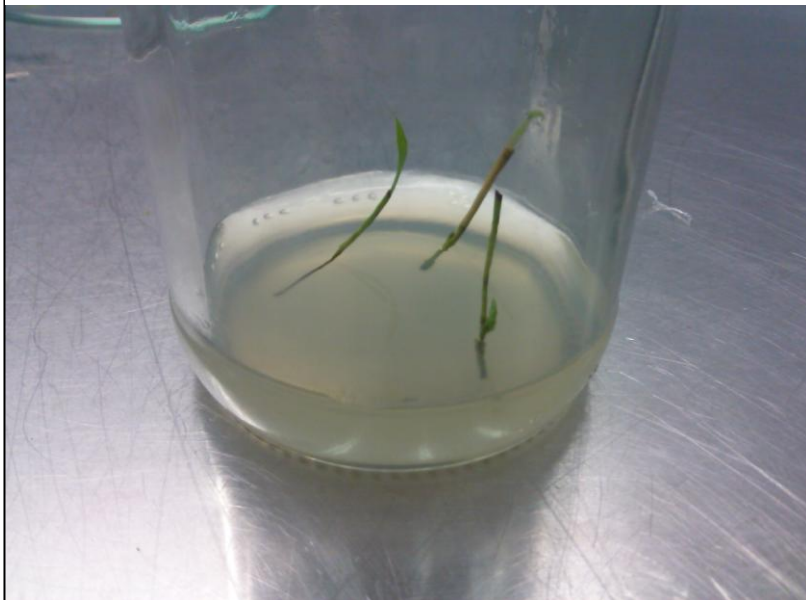
Obrázek 11: MS + PVP



Obrázek 10: Kontaminace



**Obrázek 12: Kultivace**



**Obrázek 13: MS medium**