

**Česká zemědělská univerzita v Praze,**  
Fakulta lesnická a dřevařská  
Katedra ekologie lesa



**Optimalizace *in vitro* mikropropagace morušovníku  
černého (*Morus nigra* L.)**

Diplomová práce

Autor: Bc. Pavel Švagr

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

2021



Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Pavel Švagr
Studijní program:	Lesní inženýrství
Obor:	Lesní inženýrství
Vedoucí práce:	Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.
Garantující pracoviště:	Katedra ekologie lesa
Jazyk práce:	Čeština
Název práce:	<b>Optimalizace <i>in vitro</i> mikropropagace morušovníku černého (<i>Morus nigra</i> L.)</b>
Název anglicky:	<b>Optimization of a protocol for the micropropagation of <i>Morus nigra</i> L.</b>
Cíle práce:	Optimalizace protokolu množení <i>in vitro</i> <i>Morus nigra</i> L. se zaměřením na: - porovnání koncentrace a kombinace rostlinných fytohormonů - porovnání různých živných médií (MS, WPM) - porovnání vlivu přídavku dalších látek (kasein, L-glutamin, MES, AC)
Metodika:	1) Získání kvalitních literárních zdrojů pro vypracování literární rešerše 2) Využití sterilní kultury <i>Morus nigra</i> L. v prostředí <i>in vitro</i> pro hodnocení růstu prýtů a kořenů explantátů na různých živných médiích s přidáním různých koncentrací cytokininů, auxinů a dalších látek 3) Převod rostlin z <i>in vitro</i> do <i>ex vitro</i> prostředí. 4) Získané informace o růstu budou statisticky interpretovány, porovnány s výsledky prací jiných autorů a vyhodnoceny 5) Vypracování a odevzdání diplomové práce

Doporučený rozsah 50-60 stran  
práce:

Klíčová slova: Explantátové kultury, organogenéze, auxin, cytokinin,  
živná média

Doporučené zdroje informací:

1. Bhau B.S. , Wakhlu A.K. (2001). Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 66: 25-29.
2. Bhau B.S. , Wakhlu A.K. (2003). Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. Biol. Plant. 46: 349-355.
3. Pan M.J., Staden J.V. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture — a review. Plant Growth Regul. 26: 155-163.
4. Saha S., Adhikari S., Dey T., Ghosh P. (2016). RAPD and ISSR based evaluation of genetic stability of micropropagated plantlets of *Morus alba* L. variety S-1. Meta Gene 7: 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.10.004>
5. Vijayan K., Raju P.J., Tikader A., Saratchandra B. (2014). Biotechnology of mulberry (*Morus L.*) — a review. Emir. J. Food Agric 26: 472-496.

Předběžný termín 2020/21 LS - FLD  
obhajoby:

Elektronicky schváleno: 1. 7. 2020

**prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.**

Vedoucí katedry

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma “ **Optimalizace *in vitro* mikropropagace morušovníku černého (*Morus nigra* L.)**” vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D, a použil pouze prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědom, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Brandýse nad Labem dne 15.4.2021

.....

Pavel Švagr

## **Poděkování**

Mé poděkování patří Ing. Janu Vítámvásovi, PhD., za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

## Abstrakt

Morušovník černý (*Morus nigra* L.) je ovocný strom, který je rozšířen v subtropickém a mírném pásmu severní polokoule ve stromových a keřovitých formách. Jeho původní domovinou bylo území dnešního Íránu a Afghánistánu, později se jeho výskyt rozšířil do zemí kolem Středozevního moře a dnes je oblíbeným solitérem zahrad a parků také ve středu Evropy.

V práci se zabýváme opakovanými testy růstu a kořenění morušovníku na různých živných médiích (MS, WPM, DKW) s různými typy regulátorů rostlinného růstu, tedy cytokininů ( BAP, KIN, ZEA, TDZ), auxinů (IBA, IAA, NAA), organických látek (AC, Casein, Glutamin) a jejich kombinací bylo zjištěno, že k maximálnímu růstu rostlin je nejvhodnější DKW médium bez přidaných cytokininů (výška 4.56 cm), pro multiplikaci prýtů MS médium se 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP (6.28 nových prýtů), pro úspěšné kořenění ½ koncentrace MS média s 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA (60% kořenících rostlin) a pro následný převod *ex vitro* lze doporučit přesazení rostlin do květináčků s perlitem umístěných do miniskleníků v kultivační místnosti po dobu 1 měsíce (100% přežití rostlin), následné přesazení do komerčního substrátu a uložení rostlin ve skleníku nebo fóliovníku pro další růst.

## Klíčová slova

Auxiny, biosyntéza, cytokininy, fylogeneze, fytohormony, kultivace *in vitro*, morušovník černý, růst, zakořeňování

## **Abstract**

Black mulberry (*Morus nigra* L.) is a fruit tree that is widespread in the subtropical and temperate zone of the northern hemisphere in arboreal and bushy forms. Its original homeland was the territory of today's Iran and Afghanistan. Its occurrence later spread to the various countries around the Mediterranean Sea. Today, it is also a popular solitaire of gardens and parks in central Europe.

During repeated tests of growth and rooting of mulberry on different nutrient media (MS, WPM, DKW) with different types of plant growth regulators, cytokinins (BAP, KIN, ZEA, TDZ), auxins (IBA, IAA, NAA), organic substances (AC, Casein, Glutamine) and their combination, it was discovered that the most suitable for maximum plant growth is DKW medium without added cytokinins (4.56 cm height), MS medium with 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP for shoot multiplication (6.28 new buds) and ½ concentration of MS medium with 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA for successful rooting (60% rooting plants). For subsequent *ex vitro* transfer, it is recommended to relocate the plants into pots with perlite placed in mini-greenhouses in the cultivation room for 1 month (100% plant survival). This is followed by replanting into a commercial substrate and placing the plants in a greenhouse or foil greenhouse for further growth.

## **Keywords**

Auxins, biosynthesis, cytokinins, phylogenesis, phytohormons, *in vitro* cultivation, micropropagation, black mulberry, growth, rooting

## Obsah

<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>10</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>11</b>
<b>Seznam grafů .....</b>	<b>12</b>
<b>Použité zkratky .....</b>	<b>13</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>15</b>
1.1 Fylogeneze morušovníků .....	15
1.2 Funkce fytohormonů .....	18
1.3 Auxiny - biosyntéza, transport, genová exprese, koncentrace, gravitropismus, fototropismus.....	19
1.4 Cytokininy - biosyntéza, transport, genová exprese, koncentrace .....	22
1.5 Interakce cytokininů a auxinů .....	24
1.6 Další organické látky: casein, glutamin, aktivní uhlí.....	26
1.7 Mikropropagace zaměřená především na morušovníky .....	27
1.7.1 Růst a multiplikace prýtů .....	27
1.7.2 Tvorba kořenů a aklimatizace .....	29
<b>2 Metodika a materiál.....</b>	<b>32</b>
2.1 Kultivační médium a jeho příprava.....	32
2.2 Kultivační podmínky .....	33
2.3 Růst a multiplikace prýtů .....	34
2.4 Kořenění.....	35
2.5 Přenos <i>ex vitro</i> .....	36
2.6 Statistické metody .....	36
<b>3 Výsledky.....</b>	<b>39</b>
3.1 Výsledky růstu a multiplikace prýtů .....	39
3.1.1 Výsledky růstu a multiplikace prýtů s různými koncentracemi BAP, KIN, ZEA a TDZ na MS médiu .....	39
3.1.2 Výsledky růstu a multiplikace prýtů s různými koncentracemi BAP na médiích MS, WPM a DKW .....	42
3.1.3 Výsledky vlivu temnostní fáze pro růst a multiplikace prýtů na ½ MS médiu s různou koncentrací AC.....	45



3.1.4	Výsledky růstu a multiplikace prýtlů na MS médiu s různými koncentracemi a kombinacemi glutaminu a caseinu .....	47
3.1.5	Výsledky kombinace vybraného CTKN a AUXN pro růst a multiplikaci prýtlů na MS médiu .....	49
3.1.6	Celkové grafické srovnání dat nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro růst a multiplikaci prýtlů.....	51
3.2	Dynamika růstu .....	52
3.2.1	Dynamika růstu průměrů koncentrací CTKN BAP, KIN, ZEA, TDZ na MS médiu .....	53
3.2.2	Dynamika růstu průměrů koncentrací BAP na MS, WPM a DKW médiu .....	55
3.3	Výsledky kořenění .....	56
3.3.1	Výsledky kořenění rostlin s vybranými koncentracemi IBA, IAA a NAA na ½ MS média.....	56
3.3.2	Výsledky temnostní fáze na kořenění rostlin s vybranými koncentracemi IBA na ½ MS média.....	59
3.3.3	Výsledky vlivu temnostní fáze kořenění na ½ MS médiu s různou koncentrací AC .....	60
3.3.4	Celkové grafické srovnání dat nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro kořenění .....	62
3.4	Výsledky výběrové analýzy barvy listů .....	62
3.5	Výsledky převodu <i>ex vitro</i> .....	63
<b>4</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>68</b>
4.1	Růst a multiplikace prýtlů .....	68
4.2	Tvorba kořenů a aklimatizace .....	69
	<b>Závěr a shrnutí .....</b>	<b>71</b>
	<b>Přehled literatury a zdrojů.....</b>	<b>72</b>
	<b>Přílohy .....</b>	<b>I</b>

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnocení růstu a multiplikace prýtů.....	35
Tabulka 2: Hodnocení kořenění .....	36
Tabulka 3: Sumární tabulka růstu rostlin a multiplikace prýtů na jednotlivých CTKN na MS médiu .....	40
Tabulka 4: Sumární tabulka růstu rostlin a multiplikace prýtů na médiích MS, WPM a DKW s BAP .....	43
Tabulka 5: Hodnocení vlivu AC a temnostní fáze na růst a multiplikaci prýtů.....	46
Tabulka 6: Hodnocení organických látek caseinu, glutaminu a jejich kombinace na MS médiu .....	48
Tabulka 7: Výsledky MIX CTKN BAP a AUXN IBA na MS médiu .....	49
Tabulka 8: Sumární tabulka tvorby kořínků .....	57
Tabulka 9: Hodnocení kořenění IBA na ½ MS s temnostní fází .....	59
Tabulka 10: Hodnocení kořenění AC na ½ MS s temnostní fází.....	61
Tabulka 11: Převod ex vitro po 4 týdnech .....	64
Tabulka 12: Převod ex vitro po 8 týdnech .....	64
Tabulka 13: Převod ex vitro po 8 týdnech - detail výběru .....	65

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma pozice ITS v eukaryotické jaderné ribozomální DNA .....	16
Obrázek 2: Fylogenetický strom morušovníků .....	17
Obrázek 3: Koláž fotografií výběru rostlin z fylogenetického stromu morušovníků	17
Obrázek 4: Schéma obecného mechanismu působení fytohormonu.....	18
Obrázek 5: Schéma biosyntézy IAA .....	20
Obrázek 6: Model polárního transportu IAA .....	20
Obrázek 7: Schéma genové exprese.....	21
Obrázek 8: Schéma biosyntézy cytokininů .....	23
Obrázek 9: Schéma biosyntézy cytokininů .....	24
Obrázek 10: Generalizace organogeneze rostlin.....	25
Obrázek 11: Schéma regulace hladin cytokininů v poměru k auxinu a jejich funkce při inicializaci morfogenních procesů .....	26
Obrázek 12: Příklad zadání růstových hodnot programu R (zkráceno).....	37
Obrázek 13: Výstup programu R a potvrzení hypotézy o dvou hodnotově shodných sad dat.....	38
Obrázek 14: MN rostoucí na substrátu po 8 týdnech.....	66
Obrázek 15: MN rostoucí na perlitu po 8 týdnech.....	66
Obrázek 16: Roční MN rostoucí v květináči (květen 2020) .....	67
Obrázek 17: Roční MN rostoucí ve skleníku školního podniku Truba (květen 2020) .....	67

## Seznam grafů

Graf 1: Průměrná výška rostlin po 8 týdnech s testovanými CTKN na MS médiu ...	41
Graf 2: Průměrný počet prýtů po 8 týdnech s testovanými CTKN na MS médiu .....	41
Graf 3: Srovnání průměrné výšky rostlin po 8 týdnech s BAP na médiích MS, WPM a DKW .....	43
Graf 4: Srovnání průměrného počtu prýtů po 8 týdnech s BAP na médiích MS, WPM a DKW .....	44
Graf 5: Vliv temnostní fáze a srovnání průměrných výšek ½ MS a AC .....	46
Graf 6: Vliv temnostní fáze a srovnání průměrného počtu prýtů na ½ MS a AC.....	47
Graf 7: Průměrná výška a počet prýtů casein a glutamin na MS médiu .....	48
Graf 8: Průměrná výška BAP a IBA na MS médiu .....	50
Graf 9: Průměrný počet prýtů BAP a IBA na MS médiu .....	50
Graf 10: Celkové srovnání nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro výšku explantátů po 8 týdnech .....	51
Graf 11: Celkové srovnání nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro počty nově vytvořených prýtů po 8 týdnech.....	52
Graf 12: Růstová dynamika zprůměrovaných CTKN na MS médiu .....	53
Graf 13: Detailní růstová dynamika na MS médiu dle koncentrací BAP .....	54
Graf 14: Detailní růstová dynamika na MS médiu dle koncentrací ZEA .....	54
Graf 15: Růstová dynamika zprůměrovaných BAP na MS, WPM a DKW médiu ...	55
Graf 16: Detailní růstová dynamika na DKW médiu dle koncentrací BAP .....	56
Graf 17: Graf průměrného počtu kořínků po 8 týdnech na různých koncentracích a typech AUXN.....	58
Graf 18: Graf průměrné délky kořínků po 8 týdnech na různých koncentracích a typech AUXN.....	58
Graf 19: % kořenění rostlin na ½ MS médiu s IBA a temnostní fází .....	60
Graf 20: % kořenění rostlin na ½ MS médiu s přidáním AC v koncentracích 1, 2 a 4 mg.l <sup>-1</sup> .....	61
Graf 21: Celkové srovnání dat dílčích pokusů kořenění .....	62
Graf 22: Analýza výběru světlezelené barvy listů po 8 týdnech.....	63

## Použité zkratky

2,4-D	Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
2,4,5-T	Kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	Kyselina 4-chlor-3-indolyl-octová
v	Nebo
AC	Activated charcoal, Aktivní uhlí
AUXN	Auxin(y)
BA	Benzyladenin
BAP	Benzylaminopuril
CTKN	Cytokinin(y)
DKW	Driver a Kuniyuki médium (1984)
eq.	Equal, rovná se
IAA	Kyselina indolyl-3-octová
IBA	Kyselina indolyl-3-másečná
IPA	Kyselina indol-3-propionová
KIN\Kn	Kinetin
MB	Chu a Gamborg médium (1975)
MCPA	Kyselina 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová
MIX	Test kombinace vybraných CTKN a AUXN pro růst, multiplikaci prýtů a kořenění
MS	Murashige a Skoog médium (1962)
NAA	Kyselina ALFA-naftyloctová
NOA	Kyselina BETA-naftoxyoctová
REF	Referenční (kontrolní) pokus nulových hodnot AUXN a CTKN
TDZ	Thidiazuron
TL	Trendová linie (v grafech)
WPM	Lloyd a McCown médium (1980)
ZEA	Zeatin

## Úvod

Projekt multiplikace morušovníku *in vitro* mne zaujal již při výběru vhodného tématu pro zpracování bakalářské práce, po jejíž úspěšné obhajobě jsem si chtěl prohloubit znalosti o *in vitro* množení rostlin a proto jsme uvítal možnost pokračovat v této odborné činnosti i v diplomové práci, která šířeji zkoumá použití živných médií, aplikaci cytokininů a auxinů, jejich vzájemné kombinace, nebo použití dalších organických látek při růstu explantátů. Cílem bylo pokračovat v práci k nalezení optimálního postupu úspěšné mikropropagace *Morus nigra*, tedy jak relativně rychle vypěstovat maximální počet kvalitních klonů tohoto užitečného ovocného stromu pro výsadbu.

Tento projekt je striktně veden opačným přístupem, než jakým vedl svůj pokus lancrecký král Lulu I., historik samouk a romantik, který budoucím generacím v kronice království Lancre ve svých spisech uváděl neexistující historickou postavu královny Krokuše a jeho počín je na poli bádání v knize Terryho Pratchetta „Dámy a pánové“ popsán následovně: „Odvodil díky svému pronikavému logickému úsudku z daných, byť by poněkud omezených skutečností\*, jisté závěry a zároveň extrapoloval z paralelně příbuzných pramenů\*\*.

\* Pozn. autora: *To znamená vymyslel si to.*

\*\* *Přečetl spoustu věcí, které si o tom vymysleli ostatní.*“ (Pratchett, 1992)

Všechny zmíněné odborné prameny jsou v tomto dokumentu transparentně použity a na základě těchto odborných textů probíhaly vlastní pokusy s pěstováním *Morus nigra* v laboratorní praxi. Rostliny byly měřeny, váženy, získaná data statisticky popsána a zpracována v grafické nebo tabulkové podobě a vedla k závěrům o vhodnosti či nevhodnosti použití otestovaných metod v *in vitro* podmínkách pro růst, kořenění a aklimatizaci rostlin.

Cílem této diplomové práce bylo rozšířit výzkum uvedený v bakalářské práci z roku 2019 o nové postupy a schémata v *in vitro* propagaci morušovníku černého z apikálních nebo laterálních pupenů, postupy, které by zajistily snadno replikovatelnou metodu dynamického a progresivního růstu geneticky shodných rostlin v maximálním možném počtu s výhodným množstevním poměrem vztaženým k velikosti růstové plochy a časovému rámci laboratorních prací.

# 1 Teoretická část

Teoretická část se dotkne morušovníků z pohledu evoluční příbuznosti, na základě jakých skutečností se kompletuje fylogenetický strom, dále se věnuje popisu působení cytokininů a auxinů na buněčné bázi, jejich biosyntéze, transportu, genové expresi, koncentraci a lokalizaci v rostlinných tkáních, dále popisuje jiné organické látky použité k dílčím testům v této práci a samozřejmě představuje postupy a výsledky z odborných prací, které se zabývaly mikropropagací morušovníků a jiných rostlin.

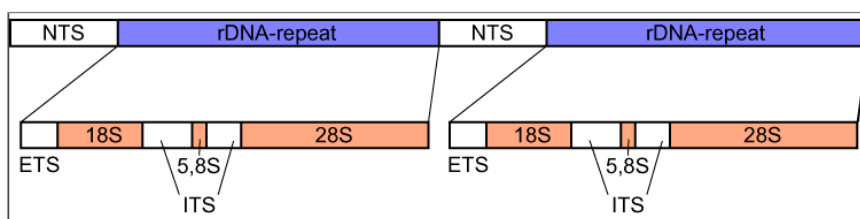
## 1.1 Fylogeneze morušovníků

Morušovníky (rod Moraceae) zahrnují třináct druhů, které rostou v Asii, Africe, Evropě a v Severní i Jižní Americe, byly a jsou z ekonomického hlediska důležité v oboru hedvábnictví, protože jsou hostitelskými rostlinami pro larvy bource morušového (*Bombyx mori* L.) a jejich zámotky jsou zdrojem hedvábných vláken. Kromě toho jsou morušovníky pěstovány v mnoha částech světa pro jejich jedlé a chutné ovoce či jako okrasné stromy parků a zahrad.

Tento rod je studijně také zajímavý pro jeho široké geografické rozšíření, morfologickou plasticitu, hybridizaci, dlouhou historii domestikace a naturalizace v areálech vzdálených od jeho původního rozšíření.

Fylogeneze se v biologii zabývá evoluční historií, tedy vývojem skupin organismů, studuje, analyzuje a hodnotí evoluční genová data organismů a na jejich základě jim přiřazuje konkrétní místo v diagramu příbuznosti s jinými organismy, který se nazývá fylogenetický strom (popř. evoluční). Fylogenetika se pokouší najít evoluční příbuznost mezi skupinami organismů pomocí molekulárních sekvenčních dat a matic morfologických dat. Zakládat příbuznost pouze na morfologii, anatomii, fyziologii a životních cyklech, může být u organismů zavádějící, protože některé společné rysy lze sice identifikovat jako stejné nebo rozdílné, ale také velmi často je taková identifikace velice nepřesná, nastupuje tedy molekulární fylogeneze, která využívá molekulární sekvenování genomu a v tomto ohledu je velmi užitečným nástrojem k pochopení fylogeneze různých taxonů. Fylogeneze je tedy nezbytná ve vědeckém studiu identifikace, klasifikace, ekologie a evolučních dějin organismů, ale je samozřejmě limitována kvalitou vstupních dat (BIOLOGY Online, 2021).

Nepal et al. (2012) ve své obsažné práci studovali fylogenezi morušovníků na základě sekvenčních dat genomu, kde lokalizovali ITS (Internal transcribed spacer) a chloroplastového trnL-trnF intergenového spaceru. ITS (Internal transcribed spacer) je nekódující sekvence DNA uložená mezi malou podjednotkou ribozomální rRNA (nekódující) a větší podjednotkou genové rRNA (kódující), která je zahrnutá do transkripce při genové expresi. Tato ITS sequence je velmi populární pro porovnávání při taxonomické a molekulární fylogenezi, protože je relativně malá a podstupuje rychlý a koordinovaný vývoj prostřednictvím nerovnoměrného křížení a genové konverze, v sekvenci bází je široce dostupná a zjistitelná ve velkém množství v kopiích rRNA clusterů, výhodou je dále její vysoká variabilita i mezi blízce příbuznými druhy organismů. Tuto variabilitu lze vysvětlit relativně nízkým vývojovým tlakem na takové nekódující sekvence. TrnL-trnF je další sekvence nekódujícího markeru plastidů, který byl lokalizován v chloroplastech odebraných ze vzorků listů. (Song et al., 2012)

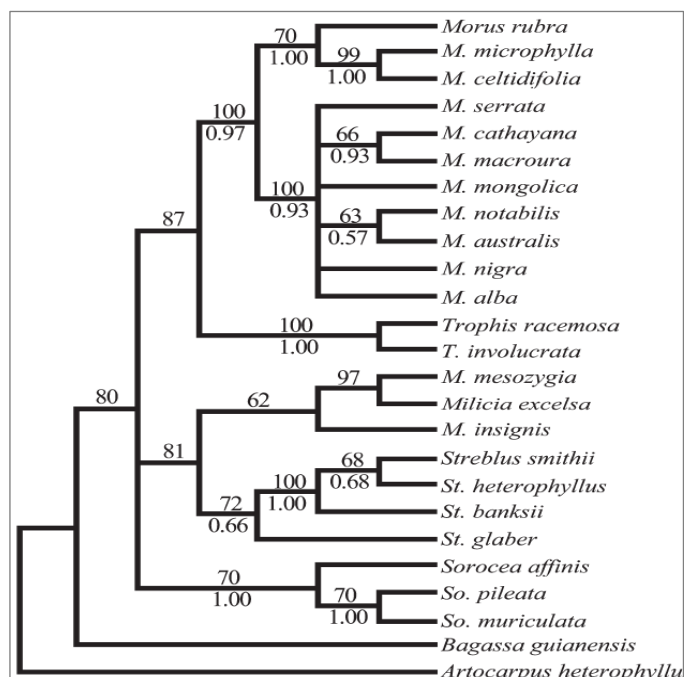


**Obrázek 1: Schéma pozice ITS v eukaryotické jaderné ribozomální DNA**

*Zdroj: Song et al., 2012*

Na základě syntézy taxonomické literatury o Moracea bylo rozlišeno třináct výrazných druhů morušovníků, původem z Asie: *M. alba*, *M. australis*, *M. cathayana*, *M. macroura*, *M. mongolica*, *M. nigra*, *M. notabilis*, *M. serrata*, původem z Ameriky: *M. celtidifolia*, *M. insignis*, *M. microphylla*, *M. rubra* a druh vyskytující se v Africe: *M. mesozygia*. Dalším studiem a analýzou sekvenčních dat nebo již uložených databázových vzorků byl zpracován fylogenetický strom pro morušovníky a jejich blízké příbuzné (Nepal et al. 2012).





Obrázek 2: Fylogenetický strom morušovníků

Zdroj: Nepal et al. 2012



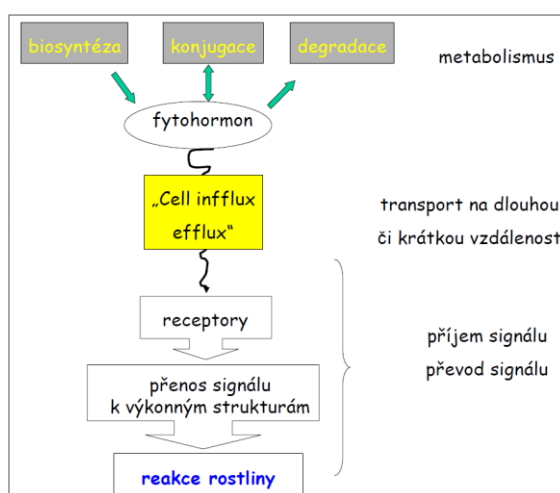
Obrázek 3: Koláž fotografií výběru rostlin z fylogenetického stromu morušovníků

Zdroj: BIOLOGY Online, 2021

## 1.2 Funkce fytohormonů

Rostlinné hormony ovlivňují mnoho aspektů růstu a vývoje rostlin. Auxiny a cytokininy jsou známy již dlouho svým potenciálem synergického nebo naopak antagonického řízení růstových a vývojových procesů v rostlinných tkáních. Interakce těchto složek v meristémech je v průběhu života rostlin základním předpokladem k formování celého rostlinného těla.

Protože jsou fytohormony v rostlinách syntetizovány na různých místech, ale jejich působení lze doložit v částech rostlin, kde vytvářeny nejsou, pak z toho plyne poznání, že rostlina tyto látky na určitém místě vyrobí a pak transportuje do míst, kde je jich potřeba k vývoji rostliny. Přesná integrace environmentálních vstupů a endogenní signalizace rostlin vyžaduje působení specifických proteinů (transportérů), které jsou základním prvkem transportu a zároveň jsou tyto transportéry nezbytnou součástí při regulaci růstu a vývoje každé rostliny. Transport na dlouhé vzdálenosti byl prokázán u mnoha rostlinných hormonů (auxiny, cytokininy, gibberliny, strigolaktony, kyselina salicyová, kyselina abscisová, kyselina jasmonová, ethylen, brasinosteroidy, polyaminy, oligopeptiny, butenolidy atd.) a zde je zapotřebí vysoce koordinovaného působení importních a exportních bílkovinných transportérů na kontaktních plochách sousedních buněk. Pouze v několika případech byla prokázána syntéza hormonu přímo v buňkách, kde byl zužitkován a pak samozřejmě odpadá využití mezibuněčných transportních mechanismů (Petrášek et al., 2009).



Obrázek 4: Schéma obecného mechanismu působení fytohormonu

Zdroj: Zažimalová et.al 2010

Významný pokrok k pochopení vzájemného působení AUXN a CTKN provedl tým Zažímalová et al. (2010) při výzkumu působení hormonů u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), kde definovali AUXN a CTKN jako rovnocenné partnery. Auxiny dokáží nastartovat organogenezi a jejich toky jsou při vývoji rostlin klíčové, speciální bílkoviny přenášejí auxin přesně určenými směry z buňky do buňky a vznikají tak oblasti s různými hladinami auxinu, kde se buňky vyvíjí odlišně. Právě tyto bílkoviny jsou řízeny působením cytokininů, tedy regulují aktivitu příslušných genů a tím i počet molekul přenašečů auxinů a následně celý auxinový tok v rostlině na molekulární úrovni řídí vývoj meristémů. Optimální koncentrace auxinů je regulována na čtyřech úrovních, biosyntézou, transportem, vnímavostí, signalizací a tato vícenásobná regulace dráhy přispívá k různé distribuci uvnitř tkání ve specifických stádiích vývoje rostliny (Zažímalová et.al 2010).

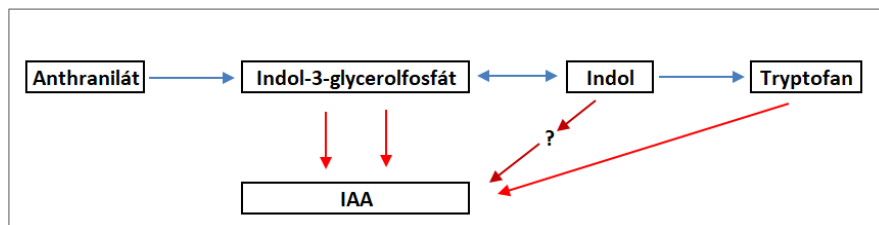
### **1.3 Auxiny - biosyntéza, transport, genová exprese, koncentrace, gravitropismus, fototropismus**

Auxiny jsou hormony, slabé organické kyseliny, které se podílí na fototropismu, geotropismu, způsobují apikální dominanci, udržují polaritu pletiv, stimulují prodlužování buněk, vývoj plodů, vývoj cévních svazků, diferenciaci vodivých pletiv a jsou primárním stimulantem růstu kořene a kořenů adventivních (Konečný, 2017). Jsou to krystalické látky dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a ve vodném alkalickém prostředí, naopak špatně rozpustné ve vodě v kyselé a neutrální oblasti (Lefnar, 2015). Přírodními auxiny jsou IAA, IBA a 4-Cl-IAA, syntetickými látkami s účinkem auxinů jsou IPA, NAA, NOA, 2,4D, 2,4,5-T, MCPA, Picloram a další.

Známé jsou dva základní projevy přítomnosti auxinu v rostlinných pletivech. První je okamžitá reakce, tedy přímý a okamžitý vliv na buňku po navázání auxinu na specifické receptory na povrchu buňky (transmembránové proteiny ABP1 (auxin-binding protein 1)), které mají za následek změny pohybu iontů přes plasmatickou membránu oběma směry a extenzi buněčné stěny. Druhým projevem, s pomalejší odezvou, je změna exprese genů.

Biosyntéza přírodního auxinu IAA probíhá v meristémech a enzymy nezbytné pro tuto syntézu jsou tedy nejaktivnější zde, dále pak v embryích a mladých listech. Od tryptofanu jsou známé dvě cesty, ale preferenční se zdá být transaminace

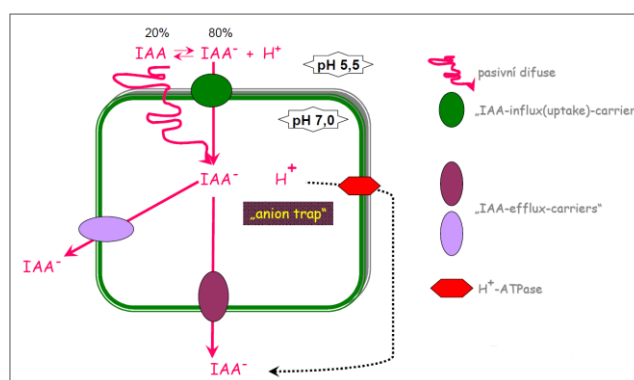
na indolpyruvát, ten dekarboxyluje (oxidace  $O^2$  a ztáta  $COOH-CO^2$  eq. degradace) na indolacetaldehyd a z něj enzymatickou oxidací vzniká IAA (Zažímalová et al., 2010).



Obrázek 5: Schéma biosyntézy IAA

Zdroj: Zažímalová et al., 2010

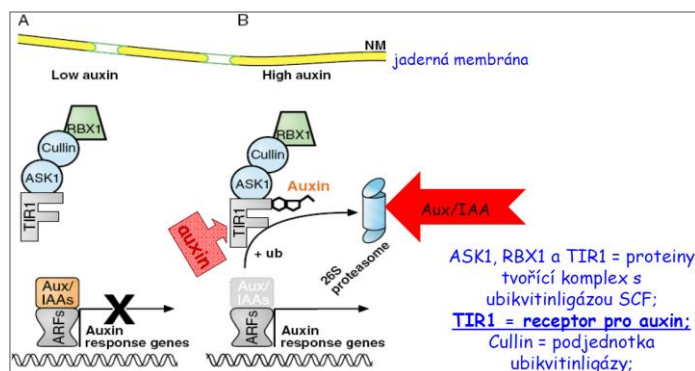
Přenos AUXN vychází s chemiosmotické hypotézy, kde se molekuly AUXN v prostředí apoplastu s hodnotou 5.5 pH vyskutují ve formě  $IAA^-$  (80%) nebo  $IAAH$  (20%). Protonová hydrofobní forma AUXN pasivně vstupuje přes buněčnou membránu do cytoplazmy kde disociuje na  $IAA^-$  a ionizovaná forma auxinu z apoplastu je přenášena do vnitřního prostředí buňky specifickými bílkovinami, které se nazývají influx přenašeči (AUX1/LAX). V cytoplazmě s pH 7.0 se tedy auxin vyskutuje výhradně ve formě  $IAA^-$  (100%) a pomocí efflux přenašečů (PIN) je dále vnitřním prostředím buňky transportován, z buňky je pak vyexpedován přenašečem PIN nebo PGP. Pokud auxin zůstane uvnitř buňky, pak se stává součástí funkční signální dráhy auxinového toku, ovlivňuje genovou expresi a aktivuje buněčné dělení (Del Pozo, 2007).



Obrázek 6: Model polárního transportu IAA

Zdroj: Zažímalová et al., 2010

V rostlinných tkáních vede vliv auxinu k prodlužování buněk a je zprostředkován změnami v transkripci genů, po vstupu do buňky, pasivním či aktivním transportem, se v cytosolu naváže na proteiny typu ARF1 (*Auxin response factor 1*). ARF1 je transkripční faktor, který vstupuje do jádra, váže se na promotory genů, které na auxin reagují (*response element*), vzápětí je auxin degradován ubikvitinligázou  $SDF^{TIR1}$ , tím dojde k uvolnění transkripčních faktorů ARF a ty aktivují transkripci genů v odpovědi na auxin (*auxin response genes*).



Obrázek 7: Schéma genové exprese

Zdroj: Zažímalová et al. 2010

Prvním mechanismem kontroly je degradace *eq.* dekarboxylace, tedy oxidace  $O_2$  a ztráta skupin  $COOH-CO_2$ , druhým pak konjugace, kdy se auxin naváže kovalentní vazbou na nízkomolekulární látky typu aminokyselin nebo cukrů, čímž redukuje množství endogenního hormonu v buňce, tím plní funkci detoxikační a takové struktury se nazývají konjugáty. Jako takové mají zásobní funkci neaktivního hormonu, chrání hormon před oxidací a v této formě jsou připraveny pro transport do dalších částí rostlinného těla (Su et al., 2011).

Gravitropismus kořenové špičky patří mezi vitální ohybové pohyby rostlin a je orientován vůči stimulu, v tomto případě vůči zemské tíži. Pozitivní gravitropismus kořene je zprostředkován ohybem kořenové špičky ve směru gravitačního vektoru a byl pozorován již v experimentech Charlese Darwina a jeho syna Francise v roce 1881. Tato schopnost je u rostlin důležitá pro jejich ukotvení v půdě, primárně souvisí se zprostředkováním dostupnosti živin, které kořeny přijímají z půdy. V celém procesu ohybu kořenové špičky hrají důležitou roli statocyty, buňky v centrální části kořenové čepičky obsahující statolity v podobě plastid s přítomností přesýpavého škrobu. Mechanismus, kterým dochází k předání

informace od plastidů se škrobem (amyloplastů) přesouvajících se v kořenové špičce ve směru gravitačního vektoru, stále není přesně znám. Zapojeny jsou v něm složky aktinového cytoskeletu a následná signální kaskáda vyvolávající přesun auxinového přenašeče PIN3 v buňkách kolumely kořenové čepičky z původní spodní plazmatické membrány na původní laterální plazmatickou membránu. Tento přesun způsobí, že auxin je dopraven do povrchových pletiv na spodní stranu kořene a tato strana se pak prodlužuje méně než horní strana kořene s následným ohybem směrem dolů (Vieten,2007).

Fototropismus patří mezi vitální ohybové pohyby rostlin a je orientován proti stimulu, kterým je dopadající sluneční záření. To je detekováno apexem, auxin je pak syntetizován v meristému a bazipetálně translokován (směrem dolů). Mechanismus, který vede k laterální distribuci auxinu a tím ke stimulaci růstu na straně odvrácené od světla, není dosud plně objasněn. Jsou v něm zapojeny proteiny zodpovědné za transport auxinů (PIN), u nichž se po změně směru osvětlení mění laterální distribuce v endodermis etiolovaného stonku (případně hypokotylu). Na osvícené straně je PIN3 lokalizován na vnitřní stranu endodermis, zatímco na straně odvrácené, kde se auxin akumuluje, je rovnoměrně rozmístěn na vnitřní i vnější stranu endodermis. Vedle tvorby auxinového gradientu napříč stonkem (hypokotylem) hraje důležitou roli také reorganizace mikrotubulárního cytoskeletu. Výsledkem je asymetrický (anizotropní) růst nebo ohyb stonku (Tylová, 2020).

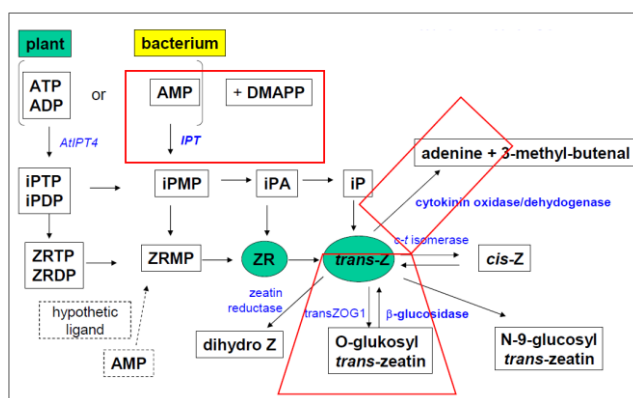
## **1.4 Cytokininy - biosyntéza, transport, genová exprese, koncentrace**

Cytokininy jsou fytohormony odvozené od adeninu a lze je rozdělit na přirozené a syntetické. Mezi přirozené izoprenoidní patří trans-zeatin, dihydrozeatin, izopentenyl adenin (IP), mezi přirozené aromatické patří benzyladenin (BA), benzylaminopurin (BAP), meta-topolin (mT) a k syntetickým se řadí kinetin (KIN\K<sub>n</sub>) a thidiazuron (TDZ). TDZ je čistě syntetická látka, která se v rostlinách nevyskytuje, ale je atraktivní z hlediska nízké koncentrace účinné látky a přesto jejího vysoce pozitivního působení v oblasti regenerace rostlinných tkání, proto se při použití tohoto hormonu používají desetinásobně menší koncentrace, než koncentrace ostatních CTKN (Schenkova, 2016).

Cytokininy hrají významnou roli při vývoji a stavbě rostlinného těla, stimulují buněčné dělení, potlačují apikální dominanci, podporují růst axilárních meristmů, iniciaci adventivních pupenů, ovlivňují vývoj kořenové části, prýtlů, semen a chloroplastů. Dále jsou funkční součástí v procesu oddálení senescence, aktivují syntézu RNA a proteinů a pomáhají rostlině zvýšit odolnost vůči stresovým faktorům typu vyššího zasolení, sucha, vlhkosti nebo vysoké teploty (Schenkova, 2016).

Primárním produktem biosyntézy jsou ribotidy vzniklé isoprenylací u rostlin ADP nebo ATP a u bakterií AMP. Donorem postranního řetězce je dimethylallyl pyrofosfát nebo (E)-hydroxymethylbutenyl difosfát za vzniku isopentenyladeninu, respektive trans-zeatinu. Vzniklé ribotidy, které jsou také transportní formou, jsou aktivovány hydrolýzou enzymy rodiny LOG (lonely guy). Jiný cytokinin, méně aktivní cis-zeatin, vzniká prenylací adenosinu v určitých molekulách tRNA a následnou hydrolýzou těchto molekul (Kurakawa et al., 2007).

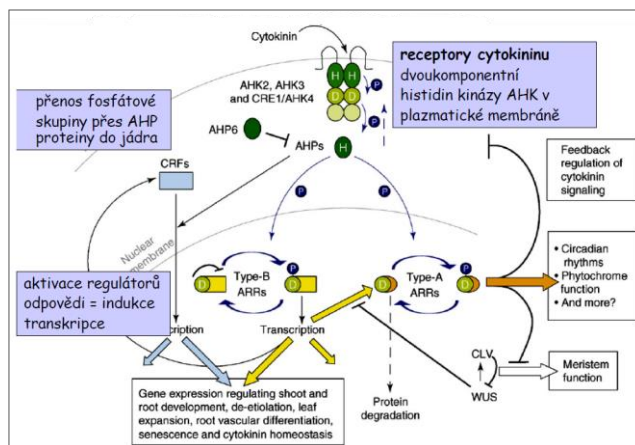
CTKN se transportují xylémem (dle klasických schémat z kořene vzhůru) a dle některých poznatků rovněž i floémem (do kořenů). Na kratší vzdálenosti jsou přenášeny transportéry rodiny PUP (purinobé permeázy) a na povrchu buněk se rovněž vyskytují membránové proteiny rodiny ENT (equilibrative nucleoside transporters), ty transportují cytokininové nukleosidy po směru gradientu koncentrace a jejich aktivita je závislá na změnách pH. Regulace množství CTKN v pletivech je stejně jako u auxinů regulována biosyntézou, aktivací, inaktivací, konjugací a degradací (Kurakawa et al., 2007).



Obrázek 8: Schéma biosyntézy cytokininů

Zdroj: Zažímalová et al., 2010

Cytokininový receptor patří mezi histidin kinázy a je přítomen na membráně endoplazmatického retikula. Po vazbě cytokininu vytvoří dimer a tento protein se transautofosforyluje na histidinu (jinými slovy, právě zdimerizované podjednotky se fosforylují navzájem). Poté je fosfát přenesen na aspartát téhož proteinu. Z aspartátu se přeneše na histidin proteinu HPT (histidine phosphotransfer, jinak též AHP), který je transportován do jádra, kde ovlivní genovou expresi za pomoci některého z proteinů ARR (Frébort et al., 2011).



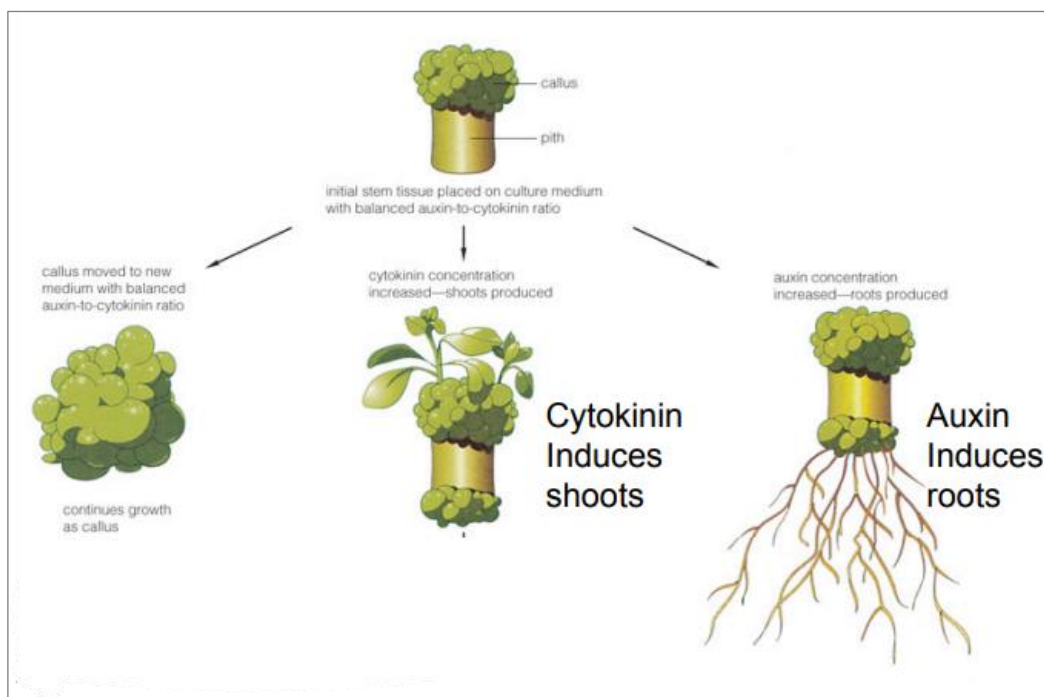
Obrázek 9: Schéma biosyntézy cytokininů

Zdroj: Zažímalová et al., 2010

## 1.5 Interakce cytokininů a auxinů

Interakce CTKN a AUXN má silný vliv na organogenezi rostlin a již Skoog a Miller (1957) svými pokusy zjistili, že různý poměr AUXN a CTKN v živném médiu podporuje růst prýtů nebo kořenů, ale jejich vztah a vzájemné působení je tou dynamickou silou, která je velice důležitá pro vývoj a růst rostlin.



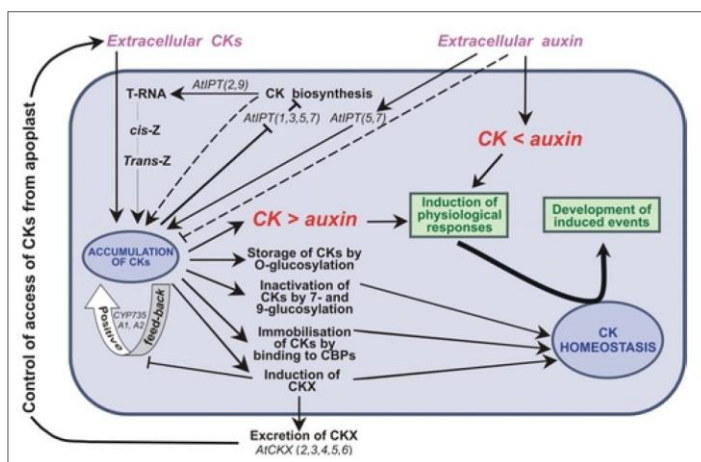


**Obrázek 10: Generalizace organogeneze rostlin**

*Zdroj: BIOLOGY Online, 2021*

Vztah AUXN a CTKN je antagonické povahy, AUXN indukuje dělení buněk meristémů, zvětšuje tato pletiva, CTKN urychlují diferenciaci meristematických buněk a snižuje velikost meristému, AUXN reguluje biosyntézu nebo degradaci složky signální dráhy CTKN a současně CTKN ovlivňují především transport AUXN z buňky změnou lokalizace proteinových bílkovin PIN/PGP a tím vytváří podmínky pro anatomické modelování rostlinných pletiv (Del Pozo, 2007). Rovnováha účinků AUXN a CTKN je kontrolována proteinem SHY2 z rodiny represorů AUXN/IAA. AUXN potlačuje expresi SHY2 spuštěním procesu degradace komplexu proteinů SCF<sup>TIR</sup>, CTKN účinek SHY2 stimuluje v přechodové zóně meristémů spuštěním transkripce pomocí aminokyselin typu B-ARR (Frébort et al., 2011). Schématické znázornění na obrázku (Obrázek 11) zjednodušeně popisuje, že ať je poměr AUXN a CTKN v meristémech jakýkoli, rostlina dostává určitý hormonální impuls, který iniciuje určitý růst a vývoj na buněčné úrovni (Pukysová, 2016). Při růstu kořenů se vzájemné interakce fytohormonů auxinu a cytokininů projevuje již v globulární fázi embryogeneze rostlin. Za zvýšené aktivity cytokininové signalizace dochází k asymetrickému dělení hypofýzy. Vznikají dvě dceřiné buňky, z nichž malá apikální buňka slouží jako prekurzor buněk klidového centra a z velké bazální buňky později vznikají meristematické buňky kořene. V bazální buňce auxin indukuje transkripci

genů ARR typu A (ARR7 a ARR15), které inhibují cytokininovou signální dráhu a napomáhají správné tvorbě kmenových buněk kořene. Bylo zjištěno, že cílená inaktivace ARR7 a ARR15 vede k vytváření defektů při růstu buněk apikálního meristému kořene a tato antagonistická interakce auxinů a cytokininů v rostlinném embryu je tedy velmi důležitá pro správný vývoj kořene (Konečný, 2015). Během vývoje embrya se auxiny a cytokininy účastní také zakládání budoucích cévních svazků. Auxin aktivuje transkripční faktor TMO5/LMH (target of monopteros5/lonesome highway), který spouští expresi genu LOG4 pro enzym biosyntézy cytokininů, které jsou pro regulaci vývoje cévních svazků nezbytné (Park et al., 2017).



Obrázek 11: Schéma regulace hladin cytokininů v poměru k auxinu a jejich funkce při inicializaci morfogenních procesů

Zdroj: Park et al., 2017

## 1.6 Další organické látky: casein, glutamin, aktivní uhlí

Glutamin syntetáza je klíčový enzym pro asimilaci amonných iontů a biosyntézu glutaminu v rostlinách. Amonné ionty jsou důležitým meziproduktem metabolismu dusíku, ve zvýšené koncentraci jsou však pro rostlinu toxické. Správné fungování glutamin syntetázy je pro rostlinu velice důležité, protože glufosinát, specifický inhibitor glutamin syntetázy, může účinkovat jako totální herbicid. Glutamin syntetáza se uplatňuje v řadě významných metabolických procesů: při primární asimilaci dusíkatých živin, při reasimilaci amonných iontů během fotorespirace či metabolismu fenypropanoidů a při remobilizaci dusíku při tvorbě semen, během klíčení nebo

senescence. Podle lokalizace v buňce se glutamin syntetázy krytosemenných rostlin dělí na plastidovou (GS2), která je kódována zpravidla jedním genem, a na cytosolickou (GS1), kterou kóduje rodina několika genů. Jednotlivé isoformy glutamin syntetáz mají rozdílnou lokalizaci v rámci rostlinných orgánů a pletiv, liší se způsobem regulace a úlohou v metabolismu dusíku (Kobercová, 2014).

Casein je aminokyselina, která je zdrojem dusíku v organické formě a rostlinami je využíván přímo k syntéze proteinů v rostlinných pletivech (Kobercová, 2014).

AC (aktivní uhlí) má pórovitou strukturu a velký vnitřní povrch (400 až 1500 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), může tak adsorbovat široké spektrum látek a jeho přidání do kultivačního média může podporovat nebo inhibovat růst *in vitro*, v závislosti na druhu rostliny, adsorbci a postupným uvolňováním růstových regulátorů a jiných organických sloučenin podporujících růst (Tewari et al., 1999).

## **1.7 Mikropropagace zaměřená především na morušovníky**

Mikropropagace rostlin je soubor laboratorních technik *in vitro* s cílem rychlého namnožení nebo naklonování rostlinného materiálu za sterilních podmínek na živných médiích. K mikropropagaci se používají meristémové buňky, tedy rostlinné pletivo tvořené především buňkami s funkcí dělivou, která obsahuje kompletní informace o rostlině, a proto je možné z malé části rostliny v podmínkách *in vitro* pěstovat nové klony.

### **1.7.1 Růst a multiplikace prýtů**

Cytokiny v rostlinných tkáních mají více funkcí a rozhoduje jejich lokace a koncentrace. Stimulují buněčné dělení, zpomalují stárnutí, zpomalují degradaci chlorofylu, stimulují diferenciaci chloroplastů, stimulují větvení a zvyšují sílu atrakce živin.

Pattnaik et al. (1997) shrnuje ve své práci, že úspěšně multiplikovali prýty jak z apikálních tak laterálních pupenů explantátů *Morus cathayana*, *Morus lhou* a *Morus serrata* na MS médiu obsahující 0.5 až 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Dodatečné přidání kyseliny gibberelové v koncentraci 0.4 mg.l<sup>-1</sup> spolu s BAP vyvolalo rychlejší růst a množství pupenů na jednotlivých explantátech. Zahájení multiplikace prýtů dané kultury však bylo do značné míry ovlivněno typem a věkem explantátu.

V práci Annis et al. (2003) s kulturou *Morus alba* na MS médiu, které bylo doplněno o BAP a Kn byla pozorována vysoká frekvence klíčení ze základu laterálních pupenů (80%) a z apikálních (70%). Proliferované výhonky *in vitro* byly rychle množeny kultivací jak laterálních tak apikálních explantátů na MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0.2 mg.l<sup>-1</sup> NAA. Tato kombinace se nejlépe osvědčila při multiplikaci prýtů. Výborných výsledků bylo také dosaženo kultivací obou druhů explantátů na MS médiu s přidaným 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP s 0.2 mg.l<sup>-1</sup> NAA, 25 mg.l<sup>-1</sup> asparginu a 1 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu. Toto specifické médium znamenalo prodloužení výhonků a klíčení laterálních pupenů v *in vitro* pěstovaných explantátů.

Tewari et al. (1999) hledali ve svém výzkumu vhodné půdy s přídavnými látkami pro růst *Morus multicaulis* a kultivarů K2, RFS175, SI *Morus indica*. Přítomnost cytokininů byla nezbytná pro rozvoj pupenů a bylo zjištěno, že TDZ v koncentraci 0.1 mg.l<sup>-1</sup> je účinnější než BAP pro množení pupenů a množení výhonků u *Morus indica* pro kultivary RFS175 a K2, zatímco 0.5 mg.l<sup>-1</sup> TDZ bylo výhodnější než BAP u *Morus indica* kultivar S1. Ačkoli TDZ zvýšil účinnost množení výhonků u *Morus indica*, bylo zjištěno, že je vhodnější použití 2.5 mg.l<sup>-1</sup> BAP v případě *Morus multicaulis*. TDZ významně snížil počet dní potřebných pro rozvoj pupenů, ale také zvýšil procento nových pupenů a počet výhonků na explantát u *Morus indica*.

Aroonpong et al. (2015) hledali systém mikropropagace *Morus alba* var. Shidareguwa, která je často používána jako rostlina terénních úprav a při konvenčním množení má malou schopnost zakořenění. Největší počet výhonků byl kultivován na MS médiu s hodnotou 20 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP po dobu 20 dnů, nejvyšší množení výhonků bylo dosaženo použitím MS média s 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP po dobu 30 dnů.

Attia et al. (2014) doporučují pro multiplikaci prýtů pro *Morus* především *alba* MS médium s přidaným 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP, Mehbooba et al. (2011) pak koncentraci 5 mg.l<sup>-1</sup> BAP pro *Morus nigra*, Medková (2013) taktéž pro *Morus nigra* WPM médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> MT.

Tripathi et al. (2010) zjistili ve své práci s explantáty *Spondias magnifera* (divoké mango), že optimální pro multiplikaci prýtů je použití MS média s přidaným 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP.

Valizadehkaj et al. (2013) srovnávali ve své práci vliv médií MS a WPM na mikropropagaci dvou íránských kultivarů *Punica granatum* (Marhaník granátový) „Malas Saveh“ a „Yousef Khani“ a preferují pro tuto rostlinu použití WPM média oproti MS médiu a pro multiplikaci prýtů přidání 1 mg.l<sup>-1</sup> Kn pro kultivar Malas Saveh a 2 mg.l<sup>-1</sup> Kn pro kultivar Yousef Khani, kde dosáhli nejvyššího počtu nových prýtů na explantát, jejich největší délky a počtu listů.

Kumari et al. (2012) ve své práci doporučují pro *Salvadora persica* (Salvadora perská) s jedlými plody pro multiplikaci prýtů MS médium s přidáním 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0.5 mg.l<sup>-1</sup> IAA.

### 1.7.2 Tvorba kořenů a aklimatizace

Auxiny v rostlinných tkáních plní různé funkce, které jsou závislé na jejich lokaci a koncentraci. Stimulují buněčné dělení, podílejí se na prodlužování buněk, apikální dominanci, stimulaci tvorby kořenů a jsou významným faktorem při gravitropismu a fototropismu.

Explantáty *Morus cathayana*, *Morus lhou* a *Morus serrata* podle Pattnaik et al. (1997) úspěšně kořenily při použití ½ koncentrace ½ MS média s 1 mg.l<sup>-1</sup> IBA ∨ IPA ∨ IAA a takto namnožené rostliny byly úspěšně aklimatizovány a přeneseny do zahradního substrátu.

Podle Annis et al. (2003) bylo celkově 80% zakořeněných rostlinek *Morus alba* získáno z explantátů kultivovaných na ½ MS doplněných o 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA a nakonec byly rostliny s dobře vyvinutými kořeny přeneseny do zahradního substrátu, kde jich přežilo 70%.

Tewari et al. (1999) konstatuje, že zakořeňování *Morus multicaulis* a kultivarů K2, RFS175, S1 *Morus indica in vitro* se významně zlepšilo přidáním aktivního uhlí do ½ MS média. Významné zvýšení procenta zakořenění a snížení dnů potřebných pro zakořenění bylo pozorováno použitím 0.05% aktivního uhlí pro *Morus multicaulis* a *Morus indica* kultivaru S1 a hodnoty 0.1% aktivního uhlí pro *Morus indica* kultivarů K2 a RFS175. Všechny rostliny pěstované *in vitro* byly úspěšně aklimatizovány a přeneseny do zahradního substrátu bez procentuální hodnoty úspěšně přeživších jedinců.

Aroonpong et al. (2015) ve své práci tvrdí, že nejlépe kořenily rostlinky *Morus alba* var. Shidareguwa za použití ½ MS média s 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy bez auxinů po dobu 30 dnů. Aklimatizace explantátů pěstovaných *in vitro* pak statisticky vykazaly 94% míru přežití v podmínkách skleníku.

Pro kořenění *Morus alba* je podle Attia et al.(2014) vhodné použít ½ MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> IBA, dle Pancho et al. (2018) ½ MS médium s 0.25 ∨ 1 mg.l<sup>-1</sup> IAA ∨ NAA, pro *Morus nigra* podle Medkové (2013) MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> CEP a Gogoi et al. (2016) pro *Morus indica* doporučují ½ MS médium s přidáním 5 mg.l<sup>-1</sup> AC a 0.5 mg.l<sup>-1</sup> NAA.

Kořenění metodou *in vitro* bylo zkoumáno v práci Sharma et al. (2012) u *Acacia leucophloea* na ¾, ½ a ¼ MS a výsledky jasně prokazují úspěšné použití koncentrace ½ MS, dále zkoumali vliv různých koncentrací sacharózy 0 až 50 g.l<sup>-1</sup>, kde byly nejlepší výsledky získány při koncentraci 30 g.l<sup>-1</sup>, dále pak bylo testováno ponořením explantátů do různých koncentrací 1 až 10 mg.l<sup>-1</sup> IBA po dobu deseti minut a přenos do ½ MS média, kde z hlediska procentuálního růstu kořenu doporučují použít koncentraci 1 mg.l<sup>-1</sup> IBA, pro délku a počet kořenů pak 10 mg.l<sup>-1</sup> IBA. Problém na všech těchto koncentracích byla vysoká míra kalusu, který eliminovalo v dalším pokusu přidání různých koncentrací 0.5 až 5 g.l<sup>-1</sup> AC do ½ MS média, kde k jasně nejlepšímu výsledku vedlo použití 2 mg.l<sup>-1</sup> AC, ale všechny koncentrace AC významně snížily tvorbu kalusu. Anis et al. (2003), kteří zkoumali použití AUXN IBA a NAA v koncentracích 0.5, 1 a 2 mg.l<sup>-1</sup> doporučili pro *Morus alba* koncentraci 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, kdy kořenilo 80 % rostlin o průměrné délce kořenů 5 cm.

Yadav et al. (1990) zkoumali kořenění *Morus nigra* s jednotlivými AUXN IBA, IAA, NAA v době trvání pouze 4 týdnů v relativně čteně nízkých koncentracích 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 mg.l<sup>-1</sup> a nejlépe hodnocena jsou kořenění na ½ MS médiu s přidáním 0.25 ∨ 1 mg.l<sup>-1</sup> IBA, dále pak 1mg.l<sup>-1</sup> IAA ∨ 1mg.l<sup>-1</sup> NAA, ve výsledcích bohužel neuvádějí procentuální úspěšnost kořenění rostlin. Chitra et al. (1998) s AUXN zkoumali indukci kořenů s AUXN IAA, IBA a 2,4-D, z výsledků plyne doporučení použít 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D, kde byla úspěšnost kořenení 87 % s průměrem nových kořínků 8,5 cm na rostlinu a průměrnou délkou kořínků 5,8 cm.

Tripathi et al. (2010) doporučuje pro úspěšné kořenění *Spondias magnifera* do ½ MS média přidání 1 mg.l<sup>-1</sup> IAA, rostliny takto vypěstované a přenesené do zahradního substrátu měly 80 až 90 % úspěšnost přežití.

Valizadehkaj et al. (2013) doporučují pro úspěšné kořenění obou kultivarů *Punica granatum* ½ koncentraci WPM média s 2 mg.l<sup>-1</sup> NAA a finální přesazení do půdy.

Kumari et al. (2012) zkoumali kořenění *Salvadora persica* na ½ MS médiu s AUXN IAA, NAA a IBA v koncentracích 0.5 až 2 mg.l<sup>-1</sup>, rostliny nejlépe kořenily na MS médiu s 1 mg.l<sup>-1</sup> IAA a po přenosu do hliněných nádob se směsí půdy a písku v poměru 3:1 deklarovali 70 % úspěšnost přežití rostlin.

Romanov et al. (2000) zkoumali vliv na tuberizaci (morfo genetický proces přeměny stonku v zásobní orgán) u sedmi druhů brambor metodou *in vitro* s různou koncentrací IAA, KIN a 1 v 5 v 8 g.l<sup>-1</sup> sacharózy. Výsledky ukazují, že maximální účinky auxinů jsou pozitivně ovlivněné vyšším obsahem sacharózy v ½ MS média a zároveň genotypem brambor.

Chutipaijit et al. (2018) zkoumali rozdíly ve vlivu klasického AC a nanokarbons na explantáty *Oryza sativa* (rýže setá) v NB médiu. Ačkoli přítomnost 100 až 500 mg.l<sup>-1</sup> AC významně snížilo procento indukce kalusu a mělo pozitivní vliv na akumulaci biomasy, s přidáním nanokarbons v koncentraci pouhých 5 mg.l<sup>-1</sup> dosáhli stejných výsledků, nejlépe pak je hodnoceno použití koncentrace 20 mg.l<sup>-1</sup> tohoto materiálu. Optimální koncentrace aktivního uhlí nebo nanokarbons má tedy skutečný pozitivní vliv na regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách.

## 2 Metodika a materiál

Odebrané mladé výhonky pro tuto práci byly zajištěny z kvalitně plodícího dospělého stromu *Morus nigra* L. rostoucího v Botanické zahradě v Brně. Z tohoto materiálu byla později v laboratoři odvozena sterilní kultura standardním postupem tak, že odebrané výhonky byly rozděleny na krátké úseky v délce cca 1 až 1.5 cm, které obsahovaly vrcholový nebo postranní pupen. Za účelem primární redukce pevných částic a mikroorganismů byl povrch materiálu omyt v roztoku cca 200 ml destilované vody se 2 až 3 kapkami smáčedla Tween 20, poté třikrát promyt čistou destilovanou vodou. Dále byla z pupenů oddělena první krycí vrtva šupin a následovalo ponoření po dobu 10 minut do sterilizační lázně 0.05 % chloridu rtuťnatého ( $HgCl_2$ ) a poté byl materiál opět třikrát propláchnut ve sterilní destilované vodě v pracovním prostředí flowboxu. Takto ošetřené prýty s pupeny byly vloženy jednotlivě do připravených sklenic s živným médiem a přeneseny do kultivační místnosti s dostatečnými světelnými a teplotními podmínkami pro jejich růst. Cyklickým opakováním pasážování vyrostlých rostlinek na čerstvé médium bylo časem získáno jejich dostatečné množství, které sloužilo pro všechny scénáře testů za účelem nalezení vhodné metodiky množení.

### 2.1 Kultivační médium a jeho příprava

Substrát, který poskytuje výživu a vhodné podmínky růstu pěstovaným rostlinkám v *in vitro* podmínkách se nazývá růstové nebo kultivační médium. Média dle použití lze rozdělit na tekutá, polotuhá a tuhá a součástí těchto médií je nejčastěji destilovaná voda, anorganické látky s nutriční funkcí, organické látky s funkcemi regulačními a energetickými, u pevných médií se dále přidává specifický zpevňující nosič. V rostlinných biotechnologiích se lze nejčastěji setkat s médii Murashige a Skoog (1962) alias MS médium, Gamborg et al. (1968) alias B5 médium, Shenk a Hildebrandt (1972) alias SH médium, Lloyd a McCown (1980) alias WPM médium, Driver and Kuniyuki (1984) alias DKW médium .

Pro růst *Morus nigra* v *in vitro* podmínkách byla použita média MS, WPM a DKW s hormony, vitamíny,  $30 \text{ g.l}^{-1}$  sacharózy viz Aroonpong et al. (2015) a jako zpevňující složka přírodní polysacharid agar, který má vysokou gelující schopnost, v koncentraci  $6 \text{ g.l}^{-1}$  (Krulich s.r.o.). Přesné složení (nejen) zde použitých médií je možné nalézt



na webovém portálu [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (Sigmaaldrich, 2021), jednotlivé ingredience byly smíchány za přesného měření v odměrných válcích a pipetováním, doplněny destilovanou vodou, dále doplněny stanovenou koncentrací fytohormonu(ů), organických látek a zpevňující agar byl přidán teprve po fixaci pH (potenciál vodíku) na hodnotě 5.7 až 5.8, kterou lze regulovat přidáním roztoku 0.1M KOH nebo 0.1M HCl, či podobných kyselin nebo zásad. Aby se agar dokonale rozpustil, byla tato směs přivedena do varu v mikrovlnné troubě, následně bylo živné médium rozděleno po cca 30 ml do předpřipravených čistých sklenic od dětské výživy o objemu cca 200 ml. Sklenice se po zavíčkování hliníkovou folií vkládaly do autoklávu značky Sanyo za účelem sterilizace, která probíhala po dobu 15 minut při tlaku 110 kPa a teplotě 121° C. Po vychladnutí sklenic bylo tuhé kultivační médium připraveno pro pasážování explantátů ve sterilních podmínkách flowboxu. Pro růst a multiplikaci prýtů byla vždy použita plná koncentrace média, pro kořenění jeho poloviční koncentrace, aby rostlinky byly tímto stresovým faktorem nuceny k rychlému rozvoji kořenového systému. Organické AC bylo přidáváno až po ustanovení pH média.

## 2.2 Kultivační podmínky

Všechna testování růstu, multiplikace prýtů, kořenění a první etapy *ex vitro* explantátů *Morus nigra* probíhalo v kultivační místnosti laboratoře rostlinných explantátů v areálu Arboreta FLD, Truba u Kostelce nad Černými lesy, kde jsou automaticky zajišťovány stálé teplotní podmínky 22° C ± 2° C a růstové regály jsou osvětleny zářivkami typu studené denní světlo firmy Philips, typ Master TL-D Super, s kódem barvy 865 až 6500 Kelvinů, světelným tokem 3250 lumenů a hustotě proudu fotonů v rozmezí 35 až 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  s denní periodou osvětlení 16 hodin svitu a 8 hodin tmy.

U testů tvorby kořenů byl zkoumán i vliv temnostní fáze na explantáty v rámci jednotlivého pokusu, kdy se část rostlin ponechala ve tmě v kultivační místnosti po dobu 7 až 10 dnů a následně byla umístěna standardně pod osvětlení v růstových regálech.

## 2.3 Růst a multiplikace prýtů

Pro testování růstu rostlin a multiplikace jejich prýtů bylo předem vytvořeno několik postupů, ale jejich parametry bylo možné dynamicky měnit v průběhu prováděných laboratorních testů.

V návaznosti na předchozí bakalářskou práci byl nově zkoumán vliv na růst a multiplikaci prýtů MN:

- a) s cytokininy KIN, ZEA v koncentracích 0.5, 1, 2, 4 a 6 mg.l<sup>-1</sup> a TDZ v koncentracích 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 a 0.6 mg.l<sup>-1</sup> na MS médiu.
- b) s cytokininem BAP v koncentracích 0,0.5,1,2, 4, 6 g.l<sup>-1</sup> na médiích WPM a DKW;
- c) s auxinem IBA v koncentracích 0.2, 0.4 mg.l<sup>-1</sup> na ½ MS médiu s temnostní fází;
- d) s kombinací auxinu IBA v koncentracích 0.1 a 0.2 mg.l<sup>-1</sup> a cytokininu BAP v koncentracích 0.5, 1, 2, 4 a 6 mg.l<sup>-1</sup> s temnostní fází;
- e) s aktivním uhlím (AC) v koncentracích 1, 2 a 4 g.l<sup>-1</sup> na ½ MS médiu (pouze doplňkové, primárně se testovala indukce kořenů);
- f) s organickými látkami, casein v koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup>, glutamin 100 mg.l<sup>-1</sup> a v kombinacích casein + glutamin v koncentraci 100 + 100 mg.l<sup>-1</sup> respektive 300 + 300 mg.l<sup>-1</sup> na MS médiu.

Explantáty ve dvou připravených sadách (primární a kontrolní) pro každou koncentraci jednotlivých CTKN, AUXN nebo organických látek, kdy jich každá obsahovala 20, byly po uplynutí 4 týdnů změřeny a přesazeny na čerstvé médium odůvodněné potencionálním vyčerpáním zásobních látek v kultivační půdě. Po dalších 4 týdnech, celkově po 8, byl každý jednotlivý pokus ukončen a získána růstová data. Růstovými daty v této fázi pokusu byla výška rostlin po 4 a 8 týdnech, počet nových prýtů po 4 a 8 týdnech, míra vitifikace a míra tvorby kalusu. Následně byla tato data zpracována, statisticky porovnána testovací a kontrolní sada a zjištěna odchylka těchto sad mezi sebou a výsledky porovnány s daty bakalářské práce.

Písmenné hodnocení ve výsledcích „ABCD“ vychází z tabulky (viz Tabulka 1), první pozice hodnotí průměrné výšky rostlin v jednotlivých koncentracích cytokininů po uplynutí 8 týdnů, druhá hodnotí počet nových prýtů, třetí procentuální vitifikaci

a čtvrtá procentuální tvorbu kalusu. První dvě pozice písmenného hodnocení v tabulce jsou primárním ukazatelem schopnosti rostlin růst a multiplikovat prýty v daném prostředí, poslední dvě pozice jsou pak doplňkovým ukazatelem vhodnosti použití dané koncentrace CTKN na použitém živném médiu.

**Tabulka 1: Hodnocení růstu a multiplikace prýtů**

Hodnocení	Výška 8 týdnů (cm)	Počet nových prýtů 8 týdnů (n)	Vitrifikace a kalus (%)
D	< 2.0	< 3.0	> 30.0
C	2.0 - 2.5	3.0 - 4.0	20.0 - 30.0
B	2.5 - 3.0	4.0 - 5.0	10.0 - 20.0
A	> 3.0	> 5.0	< 10.0

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

## 2.4 Kořenění

Pro testování tvorby a růstu kořínků rostlin bylo použito vždy kultivační médium MS v ½ koncentraci a explantáty byly připraveny ve dvou sadách (primární a kontrolní) pro každou koncentraci AUXN IAA, kdy jich každá obsahovala 20 a po uplynutí 8 týdnů byly změřeny hodnoty počtu kořenicích rostlin, délky a počty kořenů. Následně byla tato data zpracována, statisticky porovnána testovací a kontrolní sada, zjištěna odchylka těchto sad mezi sebou a výsledky porovnány s daty bakalářské práce.

Při kořenění rostlin byl zkoumán vliv:

- a) s auxinem IAA v koncentracích 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg.l<sup>-1</sup>;
- b) s 0.2 a 0.4 mg.l<sup>-1</sup> IBA;
- c) s 1, 2 a 4 mg.l<sup>-1</sup> AC s temnostní fází.

Písmenné hodnocení kořenění rostlin „ABCD“ vychází z tabulky (viz Tabulka 2), první pozice ukazuje procentech množství rostlinek, které zakořenily a je primárním ukazatelem vhodnosti použití daného AUXN. Druhá pozice ukazuje průměrný počet kořínků a třetí průměrnou délku kořínků a poslední dvě pozice jsou v hodnocení pouze ukazateli doplňkovými.

**Tabulka 2: Hodnocení kořenění**

Hodnocení	Úspěšnost kořenění (%)	Počet kořínků (n)	Délka kořínků (cm)
D	< 10.0	< 3.0	< 4.0
C	10.0 - 25.0	3.0 - 4.0	4.0 - 6.0
B	25.0 - 50.0	4.0 - 5.0	6.0 - 7.0
A	> 50	> 5.0	> 7.0

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel

## 2.5 Přenos *ex vitro*

Explantáty, které s přidanými auxiny vytvořily kořínky, byly použity k testu růstu a kořenění v nesterilním prostředí zahradního substrátu nebo perlitu v květináčích umístěných v umělohmotných minisklenicích s manuálním řízením cirkulace vzduchu a vlhkosti, které byly uloženy v kultivační místnosti a pravidelně zalévány 1/10 koncentrací MS média. Odebraným rostlinám byly nejprve zkráceny kořínky na délku cca 2 cm a před samotným vysazením byly celé propláchnuty v dezinfekčním roztoku destilované vody a hypermanganu. To sloužilo především pro eliminaci zbytků agarů mezi kořínky. Komerční substrát a perlit pro přesazení rostlin byl vybrán na základě výsledků bakalářské práce a tyto výsledky jsou v další části textu spolu verifikovány. Hlavními sledovanými výstupními hodnotami převodu *ex vitro* jsou počty rostlin, úspěšnost jejich přežití v nesterilních podmínkách po uplynutí doby 8 týdnů, průměrná výška ve 4 a 8 týdnu od zahájení pokusu. Doplňujícími výstupními hodnotami jsou na jednotlivých substrátech výšky podzemních a nadzemních částí rostlin, jejich hmotnost v čerstvém a dehydratovaném stavu.

## 2.6 Statistické metody

Růstová data získaná ve všech sekvencích testů byla zaznamenána v tabulkovém procesoru Excel, který je součástí Microsoft Office Standard 2010. Průměr jednotlivých hodnot byl stanoven klasickým aritmetickým průměrem, tedy statistickou veličinou vyjadřující typickou hodnotu popisující soubor mnoha hodnot, který se vypočítá dle vzorce:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i.$$

Protože všechny hodnoty v jednotlivých sadách měření měly stejnou váhu a důležitost, nebylo třeba využít vážený průměr. Dalším bylo vypočítání rozptylu pro jednotlivé hodnoty. Rozptyl je ve své podstatě umocněnou čtvercovou odchylkou od průměru a nabývá jen kladných hodnot. Celkový rozptyl pak je vypočítán jako průměr druhých mocnin těchto odchylek. Z této hodnoty byla pro jednotlivé soubory dat vypočítána směrodatná odchylka, která je zapsána v souhrnných tabulkách růstu, multiplikace prýtlů a kořenění, představuje variabilitu dat a počítá se dle vzorce:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Porovnání jednotlivých sad, testovacích a kontrolních, bylo provedeno pomocí programu R dvouvýběrovým t-testem. Program R je matematický software, který je zaměřen na statistické zpracování dat, testování hypotéz, analýzy rozptylů, vykreslování grafu. Zde je ukázka použití příkazové řádky programu R a jak takový výpočet iniciovat (příklad pro t-test výšky rostlin dvou sad je referenční, zjednodušený a spuštěný na webu online programu R na adrese <https://www.jdoodle.com/execute-r-online/>). Lze doporučit instalaci tohoto software na vlastní počítač, je volně stažitelný a kompilovaný pro Unixové platformy, Windows i MacOS například na adrese <https://www.r-project.org>.

```
zea_8_1 <- c(3,3.5,3,2.5,4,2.5,3)
zea_8_2 <- c(3,3,4,3,3.5,2,2.5)
t.test(zea_8_1, zea_8_2, var.equal = TRUE)
```

**Obrázek 12: Příklad zadání růstových hodnot programu R (zkráceno)**

*Zdroj: Vlastní zdroj*

Testujeme hypotézu na hladině významnosti 0.05, že testovací a kontrolní sady se od sebe významně neliší.

```
Two Sample t-test
data: zea_8_1 and zea_8_2
t = 0.22549, df = 12, p-value = 0.8254
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.6187433 0.7616005
sample estimates:
mean of x mean of y
3.071429 3.000000
```

**Obrázek 13: Výstup programu R a potvrzení hypotézy o dvou hodnotově shodných sad dat**

*Zdroj: Vlastní zdroj*

Testová statistika  $t$  nabývá hodnoty 0.22549 při 12 stupních volnosti (počet měření minus 1). Pokud je p-hodnota je 0.8254 vyšší než 0.05, pak hypotéza nulového rozdílu variability dvou sad je platná, obě sady se od sebe statisticky neliší. Poslední řádek výstupu obsahuje aritmetické průměry z měřených výšek obou sad.

Ukázka příkladu pro odmítnutí stejné hypotézy je uvedena v Příloze “*Příloha I.: Program R a zamítnutí hypotézy o dvou hodnotově stejných sadách dat*”.

### 3 Výsledky

#### 3.1 Výsledky růstu a multiplikace prýtů

Zpracované výsledky dílčích pokusů růstu a multiplikace prýtů zahrnují tabulkové, grafické a textové shrnutí.

##### 3.1.1 Výsledky růstu a multiplikace prýtů s různými koncentracemi BAP, KIN, ZEA a TDZ na MS médiu

Sledovanými výstupy růstu rostlin byla výška rostlin po 4 a 8 týdnech od zahájení pokusu, počet vytvořených nových prýtů ve stejném intervalu, procentuální vitifikace a tvorba kalusu po 8 týdnech. Získaná data byla porovnávána s výstupními daty v bakalářské práci, které operovaly a hodnotily růst rostlin v koncentracích 0 až 6 mg.l<sup>-1</sup> CTKN BAP, kde bylo nejlépe hodnocené pro růst MS médiu s přidáním 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP, pro multiplikaci prýtů MS médium s přidáním 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP (Švagr, 2019).

Analýza rozptylu naměřených hodnot primární a kontrolní sady rostlin pro stejné koncentrace CTKN na hladině významnosti 0.05 nevykazuje významný rozdíl a lze tvrdit, že oba vzorky vykazují stejné nebo zanedbatelně nízké rozdíly výsledků.

Tabulka 3 zobrazuje vypočtené hodnoty růstu na MS médiu s použitím různých koncentrací CTKN BAP, KIN, ZEA a TDZ, hodnoty BAP jsou převzaté z původní bakalářské práce (Švagr, 2019).

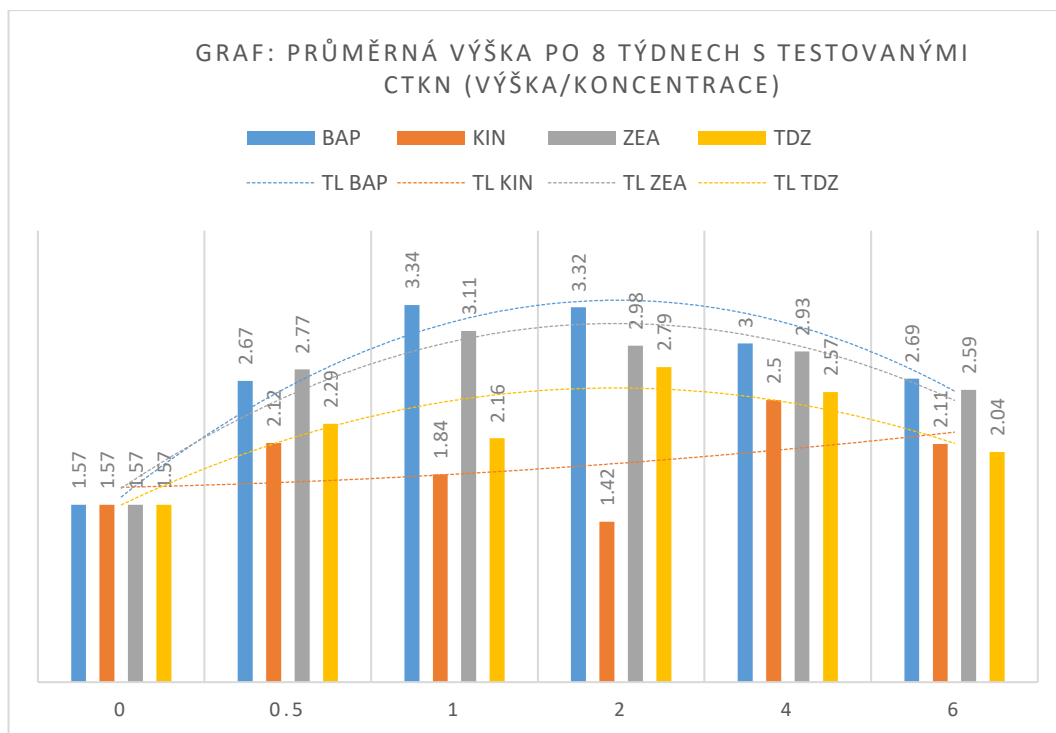
**Tabulka 3: Sumární tabulka růstu rostlin a multiplikace prýtů na jednotlivých CTKN na MS médiu**

Cytokinin	Koncentrace (mg/l)	Výška 4 týdny (cm)	Výška 8 týdnů (cm)	Prýty 4 týdny (ks)	Prýty 8 týdnů (ks)	Vitrifikace (%)	Kalus (%)	Hodnocení
---	0	1.42±0.24	1.57±0.30	1.60±0.18	2.24±0.21	4.4	6.6	DDAA
	0.5	1.61±0.49	2.67±0.62	2.69±0.26	6.11±0.28	2.4	0.0	BAAA
B	1	1.82±0.65	3.34±0.93	3.28±0.26	5.08±0.37	14.3	11.9	AABB
A	2	1.90±0.47	3.32±0.67	3.23±0.29	5.10±0.24	9.5	14.3	AAAB
P	4	1.28±0.81	3.00±1.04	2.65±0.18	6.28±0.27	26.2	16.7	AACB
	6	1.34±0.89	2.69±1.43	2.95±0.19	5.95±0.21	38.1	50.0	BADD
	0.5	0.86±0.40	2.12±0.59	1.61±0.68	3.69±1.25	0.0	0.0	CCAA
K	1	0.88±0.42	1.84±0.90	1.75±0.84	3.63±1,23	0.0	0.0	DCAA
I	2	1.29±0.47	1.42±0.72	1.57±0.49	2.67±1.11	16.7	11.9	DDDD
N	4	1.33±1.11	2.50±0.50	2.00±0.27	3.50±0.58	4.8	2.4	CCAA
	6	1.22±0.58	2.11±0.81	2.11±1.03	3.89±1.23	0.0	0.0	CCAA
	0.5	1.18±0.83	2.77±0.55	1.96±0.64	3.00±1.04	4.8	0.0	BCAA
Z	1	2.27±0.86	3.11±0.86	3.32±0.57	3.59±1.11	11.9	14.3	ACBB
E	2	1.21±0.69	2.98±0.90	2.04±0.58	2.87±0.89	9.5	0.0	BDAA
A	4	1.13±0.51	2.93±0.83	2.41±0.77	2.81±0.86	14.3	0.0	BDBA
	6	1.46±0.48	2.59±0.64	2.95±0.42	3.05±0.94	0.0	0.0	BCAA
	0.05	1.57±0.57	2.29±0.52	1.86±0.44	3.74±0.32	50.0	9.5	CCDA
T	0.1	1.92±0.54	2.16±0.48	2.73±0.37	4.76±1.21	92.9	21.4	CBDC
D	0.2	2.19±0.43	2.79±0.67	3.86±0.33	4.38±0.85	90.5	19.0	CBDB
Z	0.4	2.25±0.72	2.57±0.65	2.81±0.56	3.25±0.55	100.0	26.2	CCDC
	0.8	1.88±0.43	2,04±0.53	2.86±0.49	3.35±0.52	95.2	21.4	CCDC

	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

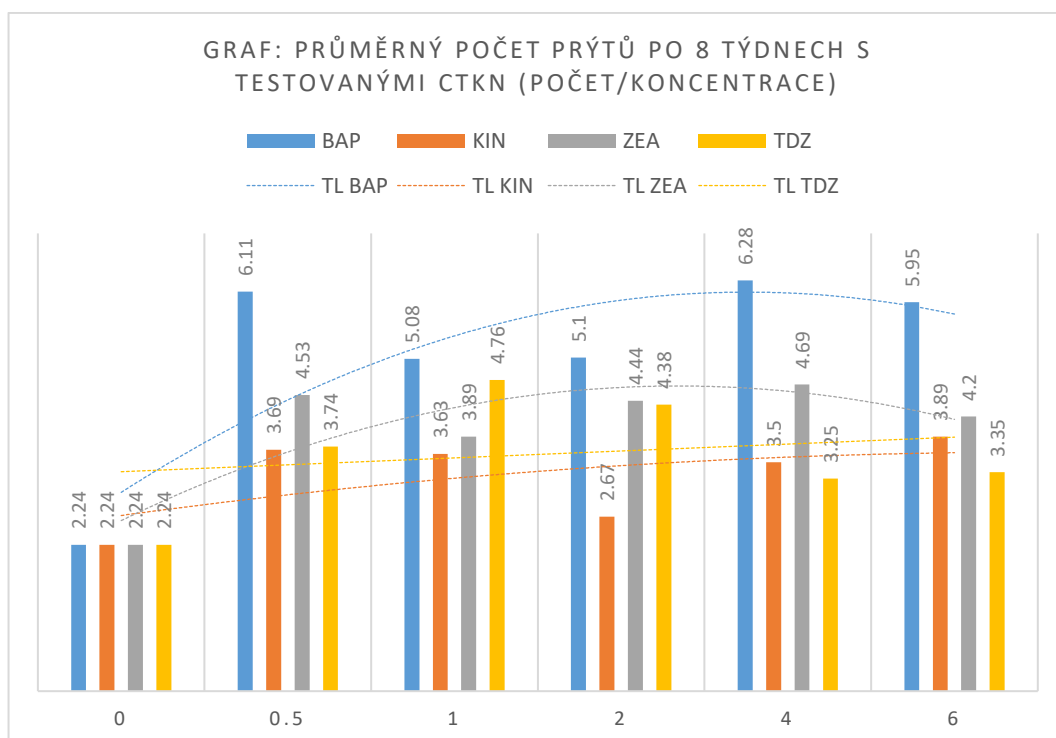
Zdroj: Vlastní zdroj, Excel





**Graf 1: Průměrná výška rostlin po 8 týdnech s testovanými CTKN na MS médiu**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 2: Průměrný počet prýtů po 8 týdnech s testovanými CTKN na MS médiu**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Dle souhrnné tabulky a grafů lze doporučit pro pěstování rostlin na MS médiu CTKN BAP, pro růst v koncentraci  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , pro multiplikaci prýtů pak  $4 \text{ mg.l}^{-1}$ . Druhým nejlepším výsledkem byl hodnocen CTKN ZEA v koncentraci  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  pro růst, při multiplikaci byly vhodnější všechny ostatní koncentrace BAP než jakékoli jiné koncentrace KIN, ZEA a TDZ.

Podle t-testu pro růst nabývá p-hodnota mezi BAP a KIN 0.00239, mezi BAP a ZEA 0.4754, mezi BAP a TDZ 0.01314, mezi KIN a ZEA 0.002318, mezi KIN a TDZ 0.1372, mezi ZEA a TDZ 0.01496 a lze tvrdit, že statisticky jsou datové sady BAP a ZEA shodné a výsledkově lepší než datové sady KIN a TDZ.

Podle t-testu pro počet nových prýtů nabývá p-hodnota mezi BAP a KIN 0.0001505, mezi BAP a ZEA 0.000175, mezi BAP a TDZ 0.001658, mezi KIN a ZEA 0.1413, mezi KIN a TDZ 0.2786, mezi ZEA a TDZ 0.03337 a lze tvrdit, že statisticky je datová sada BAP výsledkově nadřazena všem ostatním použitým cytokinům.

### **3.1.2 Výsledky růstu a multiplikace prýtů s různými koncentracemi BAP na médiích MS, WPM a DKW**

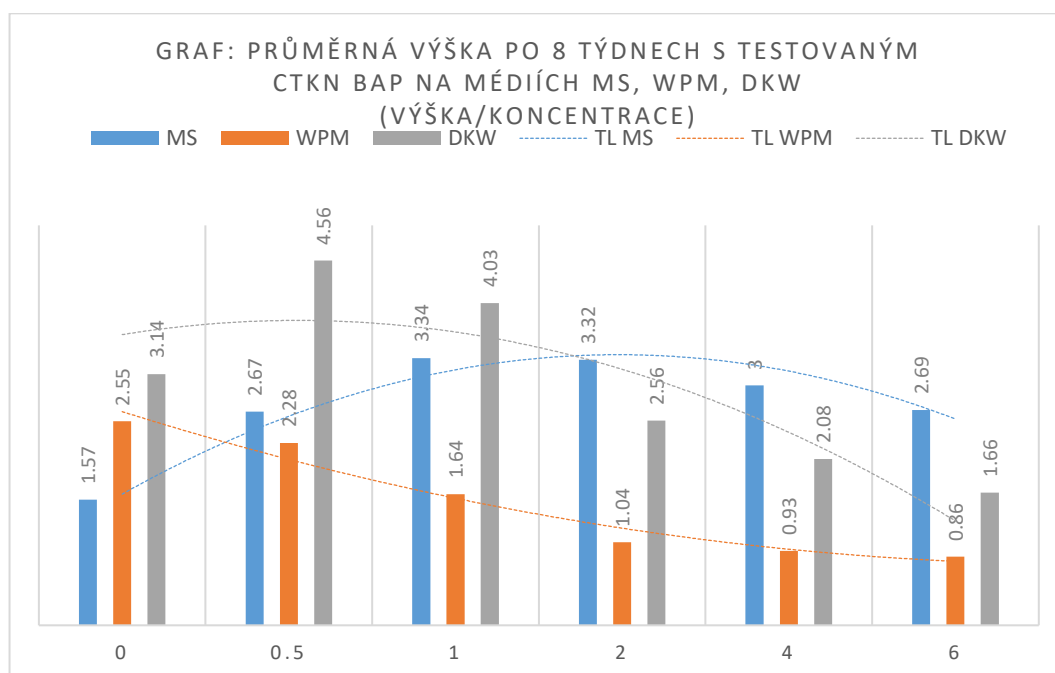
V těchto testech bylo zjišťováno, zda použití živného média s jiným složením látek bude mít vliv na růst rostlin oproti předchozímu testu CTKN BAP na MS médiu, proto byly stejné koncentrace BAP použity na médiu WPM (Lloyd a McCown, 1980) a DKW (Driver a Kuniyuki, 1984).

**Tabulka 4: Sumární tabulka růstu rostlin a multiplikace prýtů na médiích MS, WPM a DKW s BAP**

Médium	Koncentrace (mg/l)	Výška 4 týdny (cm)	Výška 8 týdnů (cm)	Prýty 4 týdny (ks)	Prýty 8 týdnů (ks)	Vitrifikace (%)	Kalus (%)	Hodnocení
M	0	1.42±0.24	1.57±0.30	1.6±0.18	2.24±0.21	4.8	9.5	DDAA
	0.5	1.61±0.49	2.67±0.62	2.69±0.26	6.11±0.28	2.4	0.0	BAAA
	1	1.82±0.65	3.34±0.93	3.28±0.26	5.08±0.37	14.3	11.9	AABB
	2	1.90±0.47	3.32±0.67	3.23±0.29	5.10±0.24	9.5	14.3	AAAB
	4	1.28±0.81	3.00±1.04	2.65±0.18	6.28±0.27	26.2	16.7	AACB
	6	1.34±0.89	2.69±1.43	2.95±0.19	5.95±0.21	38.1	50.0	BADD
W	0	0.92±0.44	2.55±0.56	1.19±0.37	3.52±0.26	14.3	35.7	BCBD
	0.5	0.83±0.27	2.28±0.76	1.12±0.21	3.08±0.31	19.0	23.8	CCBC
	1	0.78±0.66	1.64±0.43	1.14±0.23	2.47±0.26	16.7	40.5	CDBD
	2	0.84±0.21	1.04±0.25	1.43±0.16	1.55±0.20	9.5	73.8	DDDD
	4	0.75±0.35	0.93±0.28	1.31±0.43	1.44±0.32	16.7	88.1	DDDD
	6	0.73±0.32	0.86±0.34	1.29±0.39	1.41±0.29	26.2	100.0	DDDD
D	0	1.39±0.57	3.14±0.28	2.81±0.35	4.08±0.33	16.7	11.9	ABBB
	0.5	2.13±1.09	4.56±0.19	3.09±1.03	4.67±0.59	14.3	19.0	ABBB
	1	2.36±0.89	4.03±0.33	3.62±0.82	5.19±0.77	14.3	16.7	AABB
	2	1.79±0.46	2.56±0.55	3.65±0.52	5.54±0.21	21.4	23.8	BABC
	4	1.68±0.57	2.08±0.76	3.21±0.37	4.89±0.47	16.7	31.0	CBCD
	6	0.95±0.33	1.66±0.39	1.65±0.35	3.52±0.89	33.3	52.4	DCDD

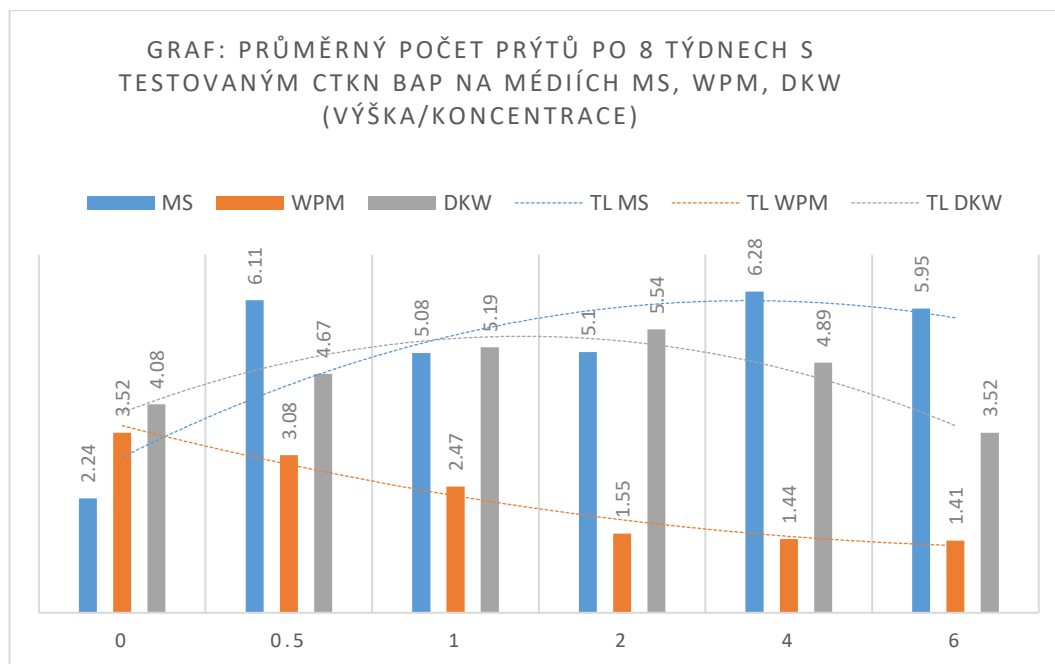
	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel



**Graf 3: Srovnání průměrné výšky rostlin po 8 týdnech s BAP na médiích MS, WPM a DKW**

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel



**Graf 4: Srovnání průměrného počtu prýtů po 8 týdnech s BAP na médiích MS, WPM a DKW**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Výsledky růstu na MS médiu jsou příznivé, v celé škále koncentrací BAP jsou výsledky velmi consistentní a médium lze hodnotit jako vhodné pro pěstování MN v *in vitro* podmínkách. Nejlépe hodnocené jsou pak koncentrace 1 a 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP pro růst a 0.5, 4 a 6 mg.l<sup>-1</sup> pro multiplikaci prýtů, kde bylo dosaženo nejvyššího hodnocení ze všech testovaných živných médií.

Podle t-testu pro růst nabývá p-hodnota mezi MS a DKW 0.6614, mezi MS a WPM 0.0125, mezi DKW a WPM 0.0241 a lze tvrdit, že statisticky jsou datové sady MS a DKW shodné a výsledkově lepší než data získaná pro WPM.

Podle t-testu pro počet nových prýtů nabývá p-hodnota mezi MS a DKW 0.5006, mezi MS a WPM 0.002488, mezi DKW a WPM 0.0005413 a lze tvrdit, že statisticky jsou datové sady MS a DKW shodné a výsledkově lepší než data získaná pro WPM.

WPN médium lze hodnotit jako nevhodné pro *Morus nigra* s nevyhovujícími výsledky růstu. Rostliny na tomto médiu viditelně neprosplávaly, nažloutlé listy rostlin a výrazné množství kalusu již po prvních týdnech kultivace naznačovaly, že pokus bude neúspěšný z hlediska kultivace. To se po 8 týdnu potvrdilo a zjednotlivých grafů je patrné, že při růstu dosahovaly rostliny velmi slabých výsledků oproti rostlinám

rostoucím na médiích MS a DKW, jak v růstu tak multiplikaci. Médium WPM proto nelze doporučit pro další pokusy o multiplikaci těchto rostlin v podmínkách *in vitro*.

DKW médium v testech růstu lze hodnotit jako nejlepší testované médium, růstové hodnoty rovnoměrně klesají se stoupající koncentrací BAP, dokonce i použití čistého DKW média mělo za následek nadprůměrný růst rostlin. Nadstandardních výsledků v růstu bylo dosaženo u koncentrací 0.5 a 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP na DKW médiu, rostlinky měly tmavězelené listy a některé z nich dosahovaly výšky přes 8 cm po 8 týdnech. Okulárně a subjektivně bylo pro rostliny použité médium DKW velmi vhodné, rostlinky a listy měly sytě zelenou barvu, vitifikace a kalus byly zanedbatelné. Výsledky multiplikace na DKW médiu byly velmi konzistentní a nejlépe bylo hodnoceno použití 1 a 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP.

### **3.1.3 Výsledky vlivu temnostní fáze pro růst a multiplikace prýtů na ½ MS médiu s různou koncentrací AC**

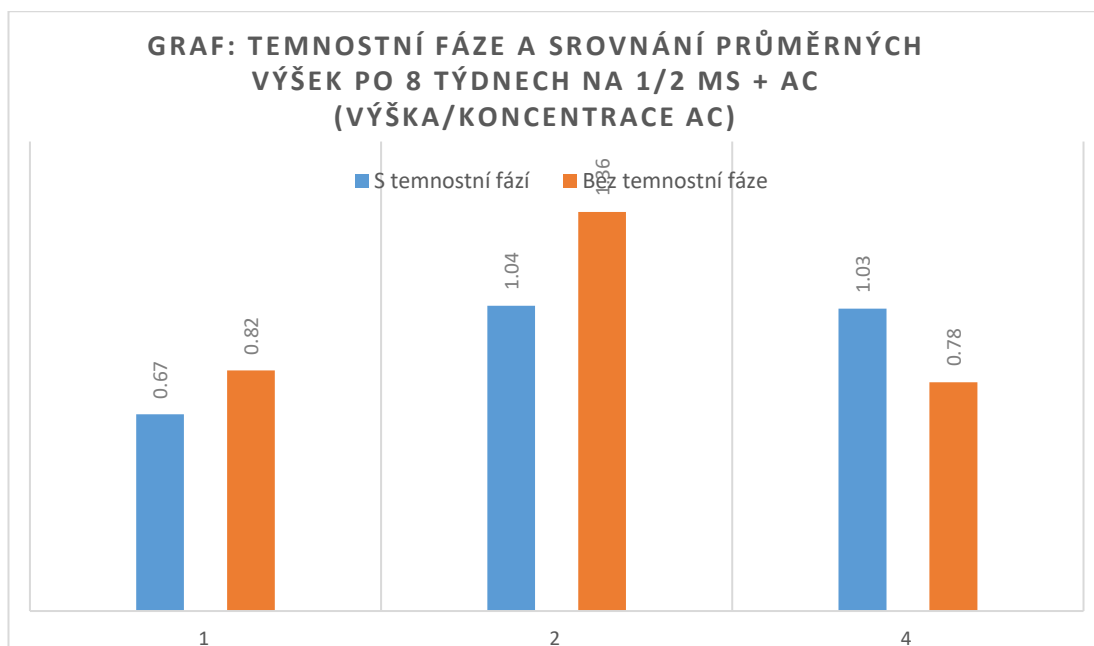
Ačkoli bylo použití AC míněno jako test kořenění, v této kapitole je porovnán růst a multiplikace prýtů z posbíraných dat s vlivem temnostní fáze na explantáty v rámci jednotlivého pokusu, kdy se část rostlin ponechala ve tmě v kultivační místnosti po dobu 10 dnů a teprve potom byla umístěna standardně pod osvětlení v růstových regálech. Rostliny byly nasazeny do ½ MS média a bylo přidáno 1, 2 a 4 mg.l<sup>-1</sup> AC, detailněji popsáno v kapitole 3.3.3. Hodnota „0“ v tabulce znamená, že pokus proběhl bez temnostní fáze, hodnota „1“, že pokus proběhl s temnostní fází.

**Tabulka 5: Hodnocení vlivu AC a temnostní fáze na růst a multiplikaci prýtů**

AC	Temnostní fáze	Výška 8 týdnů	Počet nových prýtů 8 týdnů	Vitrifikace	Kalus	Hodnocení
mg/l	- - -	cm	ks	%	%	- - -
1	0	0.82±0.15	2.83±0.17	0.0	0.0	DDAA
2	0	1.36±0.19	4.58±0.31	0.0	0.0	DBAA
4	0	0.78±0.15	3.42±0.23	0.0	0.0	DCAA
1	1	0.67±0.10	2.58±0.16	0.0	0.0	DDAA
2	1	1.04±0.27	3.67±0.24	0.0	0.0	DCAA
4	1	1.03±0.24	4.17±0.27	0.0	0.0	DBAA

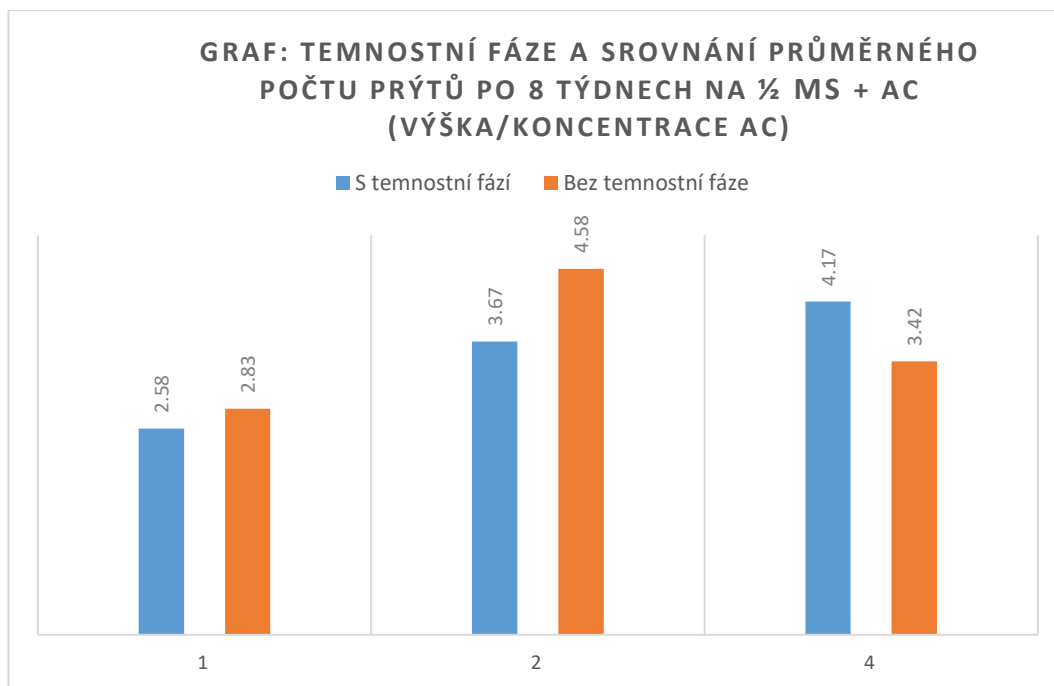
	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 5: Vliv temnostní fáze a srovnání průměrných výšek ½ MS a AC**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 6: Vliv temnostní fáze a srovnání průměrného počtu prýtů na ½ MS a AC**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z grafů porovnávající výšky a počty prýtů mezi rostlinami s a bez temnostní fáze lze konstatovat, že temnostní fáze neměla pozitivní vliv na růst těchto rostlin po přidání 1 a 2 mg.l<sup>-1</sup> AC, mírně lépe tomu bylo u 4 mg.l<sup>-1</sup> AC. Tyto výsledky jsou pouze nadstavbovým srovnáním růstu s a bez temnostní fáze na ½ koncentraci MS média, tedy nejsou relevantní vůči testům CTKN a dalších organických látek na různých médiích v plných koncentracích médií.

### **3.1.4 Výsledky růstu a multiplikace prýtů na MS médiu s různými koncentracemi a kombinacemi glutaminu a caseinu**

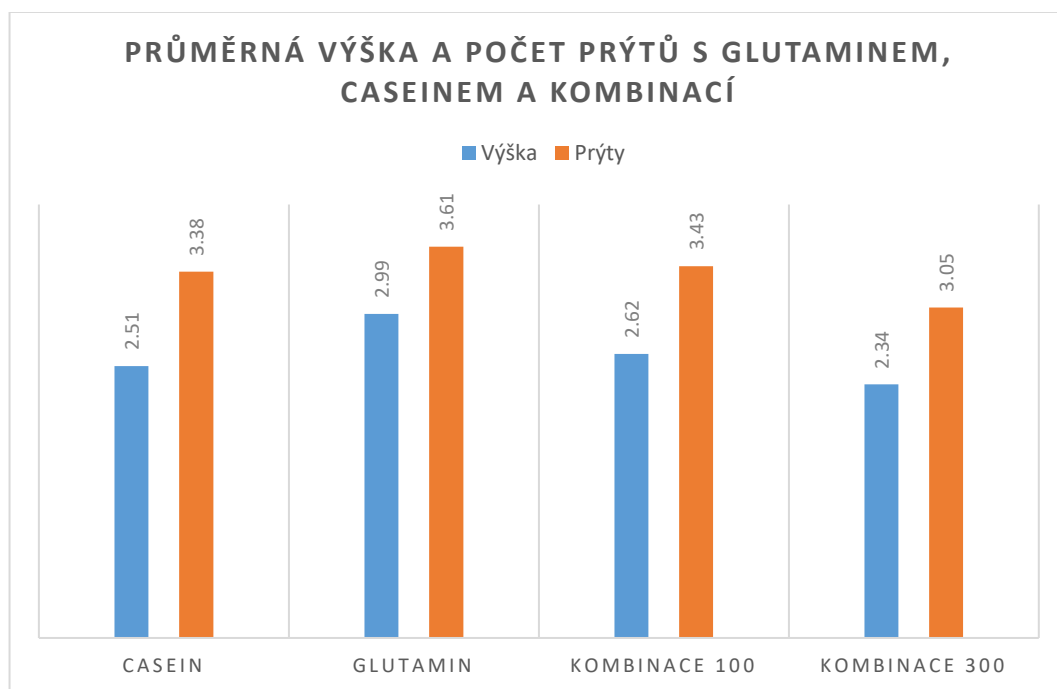
V tomto testu byly rostlinky nasazovány na MS médium s přidáním 100 mg.l<sup>-1</sup> caseinu, 100 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu a dvou kombinací caseinu a glutaminu v koncentracích 100 a 100 mg.l<sup>-1</sup> respektive 300 a 300 mg.l<sup>-1</sup> společně.

**Tabulka 6: Hodnocení organických látek caseinu, glutaminu a jejich kombinace na MS médiu**

Médium	Casein (mg/l)	Glutamin (mg/l)	Výška 4 týdny (cm)	Výška 8 týdnů (cm)	Prýty 4 týdny (ks)	Prýty 8 týdnů (ks)	Vitrifikace (%)	Kalus (%)	Hodnocení
M S	0	0	1.42±0.24	1.57±0.30	1.60±0.18	2.24±0.21	4.8	9.5	DDAA
	100	0	1.99±0.22	2.51±0.25	3.06±0.31	3.38±0.35	0	0	BCAA
	0	100	2.31±0.30	2.99±0.44	3.11±0.26	3.61±0.40	0	11.9	BCAB
	100	100	2.05±0.21	2.62±0.29	3.26±0.31	3.43±0.33	26.2	19	BCCB
	300	300	1.81±0.17	2.34±0.26	2.92±0.22	3.05±0.29	42.9	78.6	CCDD

	Nejllepší výsledek dílčího pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel



**Graf 7: Průměrná výška a počet prýtů casein a glutamin na MS médiu**

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel

Z tabulky a grafů lze odvodit, že použití těchto organických látek sice mělo pozitivní vliv na růst a multiplikaci prýtů proti použití pouze čistého MS média, ovšem ve srovnání s použitím růstových regulátorů nebo jiných typů živných médií jsou to výsledky celkem průměrné. Nejlépe hodnocené pro růst a zároveň multiplikaci v tomto pokusu bylo MS médium s přidáním 100 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu.



### 3.1.5 Výsledky kombinace vybraného CTKN a AUXN pro růst a multiplikaci prýtů na MS médiu

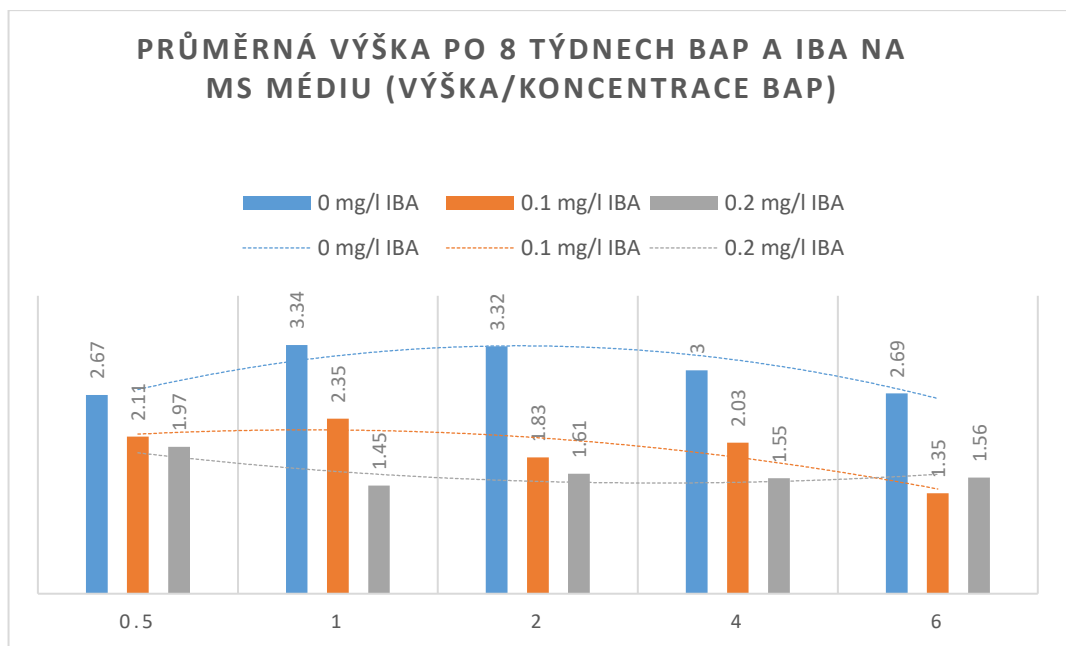
V tomto testu bylo zjišťováno, zda se pozitivně či negativně projeví interakce AUXN a CTKN přidaných společně do MS média pro růst *Morus nigra* v porovnání s výsledky testů různých fytohormonů a bylo zvoleno použití CTKN BAP v koncentraci 0.5 až 6 mg.l<sup>-1</sup> a AUXN IBA v koncentraci 0.1 a 0.2 mg.l<sup>-1</sup>. Analýza rozptylu naměřených hodnot primární a kontrolní sady rostlin pro stejné koncentrace AUXN a CTKN na hladině významnosti 0.05 nevykazuje významný rozdíl a lze tvrdit, že oba vzorky vykazují stejné nebo zanedbatelně nízké rozdíly výsledků.

Tabulka 7: Výsledky MIX CTKN BAP a AUXN IBA na MS médiu

BAP	IBA	Výška 8 týdnů	Počet nových prýtů 8 týdnů	Vitrifikace	Kalus	Hodnocení
mg/l	mg/l	cm	ks	%	%	---
0.5	0.0	2.67±0.62	6.11±0.28	2.4	0.0	BAAA
1	0.0	3.34±0.93	5.08±0.37	14.3	11.9	AABB
2	0.0	3.32±0.67	5.10±0.24	9.5	14.3	AAAB
4	0.0	3.00±1.04	6.28±0.27	26.2	16.7	AACB
6	0.0	2.69±1.43	5.95±0.21	38.1	50.0	BADD
0.5	0.1	2.11 ± 1.01	3.75 ± 1.56	45.2	69	CCDD
1	0.1	2.35 ± 0.76	4.47 ± 1.28	11.9	88.1	CBBD
2	0.1	1.83 ± 0.37	4.63 ± 0.98	7.1	85.7	DBAD
4	0.1	2.03 ± 0.46	5.09 ± 1.08	19	54.8	CABD
6	0.1	1.35 ± 0.41	3.73 ± 1.05	71.4	81	DCDD
0.5	0.2	1.97 ± 0.22	2.62 ± 1.00	33.3	42.9	DDDD
1	0.2	1.45 ± 0.14	2.11 ± 0.89	4.8	95.2	DCAD
2	0.2	1.61 ± 0.23	2.47 ± 0.77	61.9	57.1	DCDD
4	0.2	1.55 ± 0.28	2.38 ± 1.00	52.4	42.9	DCDD
6	0.2	1.56 ± 0.39	2.76 ± 1.05	76.2	66.7	DBDD

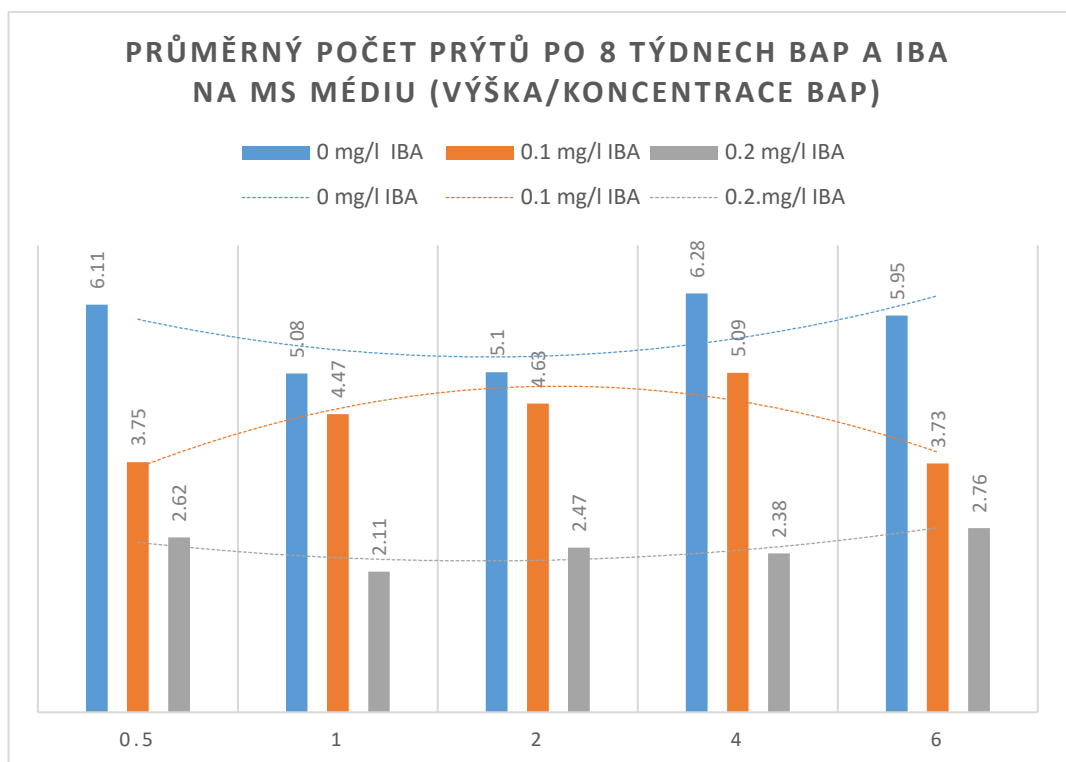
	Nejllepší výsledek dílčího pokusu
	Nejllepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel



**Graf 8: Průměrná výška BAP a IBA na MS médiu**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



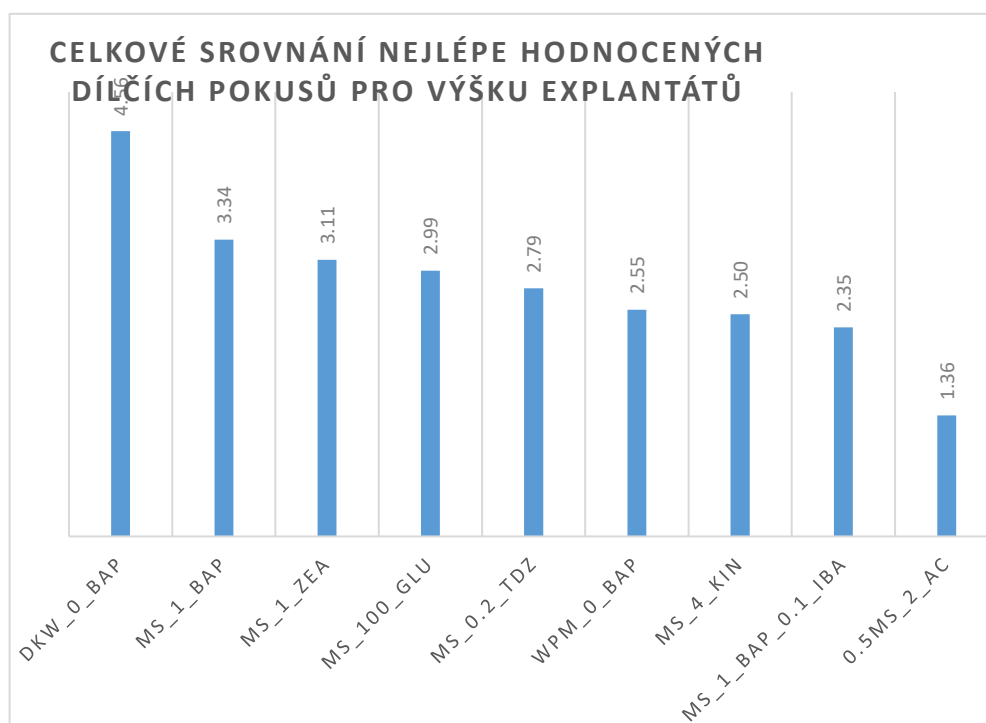
**Graf 9: Průměrný počet prýtů BAP a IBA na MS médiu**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

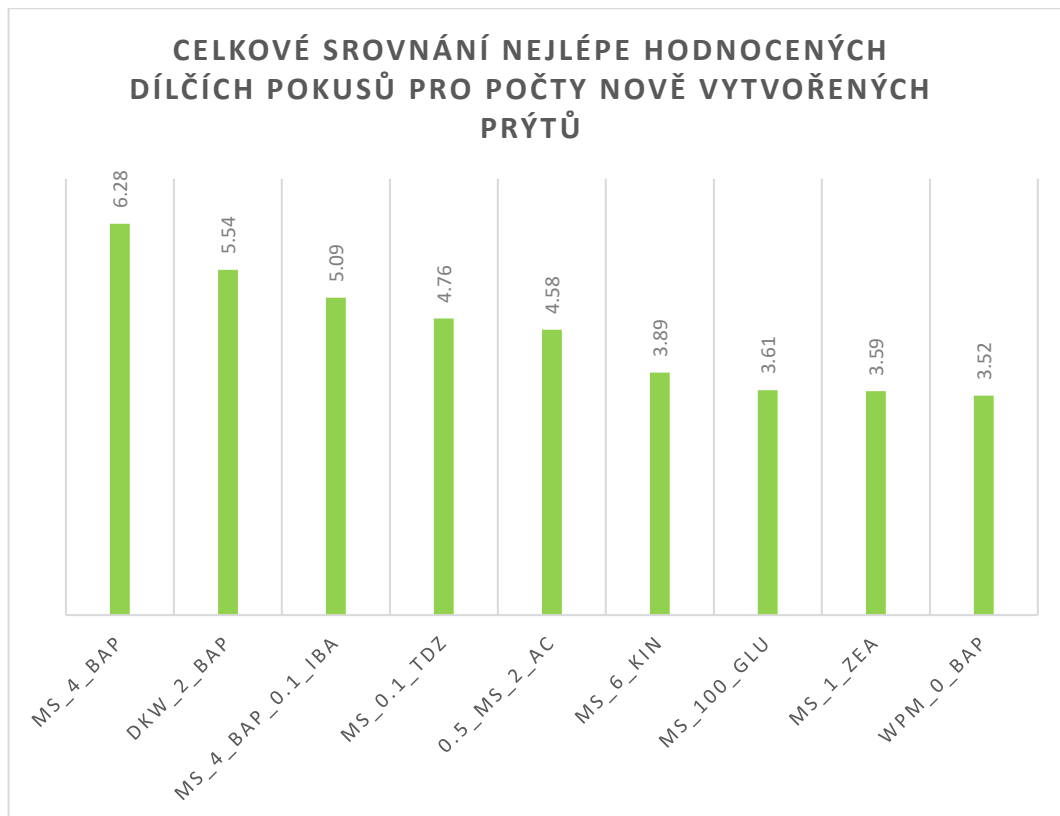
Ze sumární tabulky a grafů lze odvodit, že interakce auxinu k cytokininu v tomto testu nevedlo ke zlepšení růstu rostlin a multiplikaci prýtů. Na takto upraveném živném médiu rostlinky méně přirůstaly než při použití pouze CTKN, dosahovaly vyšší míry kalusu a u silnějších koncentrací IBA i vyšší míru vitrifikace. Lze tedy konstatovat, že při použité kombinaci CTKN 0.5 až 6 mg.l<sup>-1</sup> BAP a AUXN 0.1 v 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA byly zaznamenány výrazně horší výsledky, než pouhé použití CTKN na MS médiu a tuto kombinaci nelze pro multiplikaci doporučit.

### 3.1.6 Celkové grafické srovnání dat nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro růst a multiplikaci prýtů

Následující grafy jsou sestupně pospojované nejlepší výsledky dílčích testů růstu rostlin a multiplikace prýtů po 8 týdnech všech testů v kapitole „Výsledky růstu a multiplikace prýtů“, to ovšem znamená, že i horší výsledek v dílčích pokusech může být hodnotnější, než výsledek nejlépe hodnoceného dílčího pokusu, jak vyplývá ze sumarizace výsledků růstu rostlin s CTKN na MS a DWK médiích, proti výsledkům růstu WPM médiu.



**Graf 10: Celkové srovnání nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro výšku explantátů po 8 týdnech**



**Graf 11: Celkové srovnání nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro počty nově vytvořených prýtů po 8 týdnech**

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel

### 3.2 Dynamika růstu

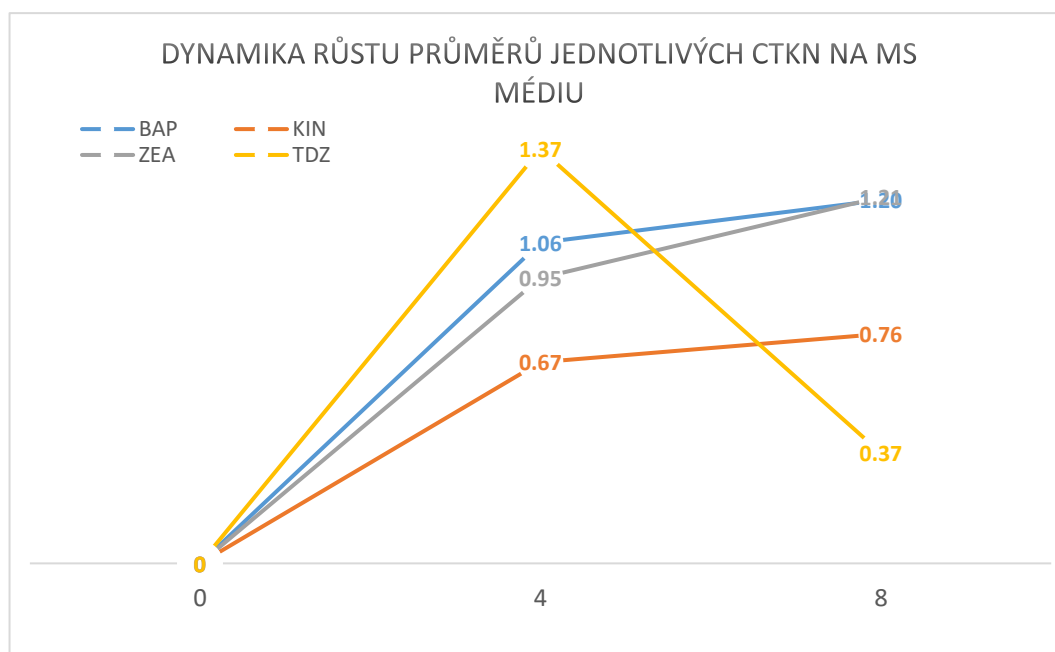
Graf dynamiky růstu znázorňuje zprůměrované přírůsty pomocí vektorů mezi nultým a čtvrtým, mezi čtvrtým a osmým týdnem pokusu a zobrazuje tedy potenciál růstu rostlin v daném časovém intervalu. Bodem zlomu těchto linií je doba přenosu rostlin na nové médium, tedy ve čtvrtém týdnu od založení pokusu. Čím je strmější grafická linie, tím je dynamika růstu rostlin v daném časovém intervalu výraznější a naopak klesající tendence období mezi čtvrtým a osmým týdnem u jednotlivých linií avizuje pokles dynamického růstu oproti době mezi nultým a čtvrtým týdnem.

Vektor dynamiky v grafech začíná na velikosti 0.5 cm nasazených rostlinek do sklenic, v bodu zlomu je vypočítán rozdílem výšky rostliny po 4 týdnech růstu a počáteční velikostí. Vektory končí v bodu rozdílu celkové výšky rostlin po 8. a po 4. týdnu růstu.

Tyto grafy neurčují vhodnost či nevhodnost použití fytohormonů, jen deklarují průměrnou akceleraci růstu rostlin během prvních a druhých čtyř týdnů pokusu.

### 3.2.1 Dynamika růstu průměrů koncentrací CTKN BAP, KIN, ZEA, TDZ na MS médiu

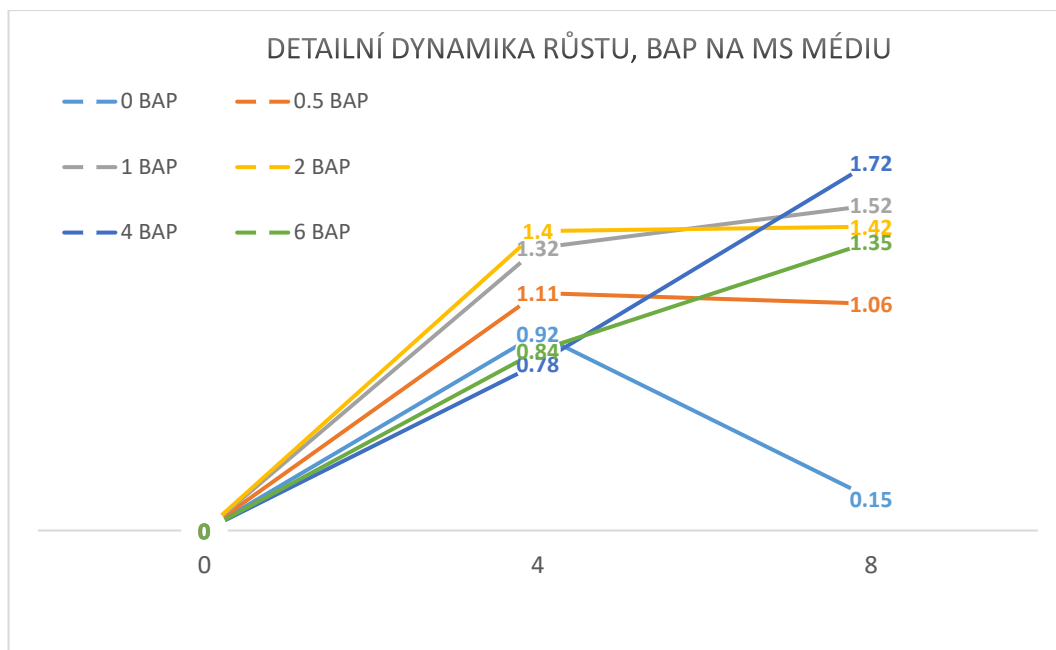
Tento graf může sloužit jen jako pomocný parametr konečného výběru živného média a vhodného CTKN pro maximální růstový zisk *Morus nigra* v *in vitro* podmínkách na MS médiu.



**Graf 12: Růstová dynamika zprůměrovaných CTKN na MS médiu**

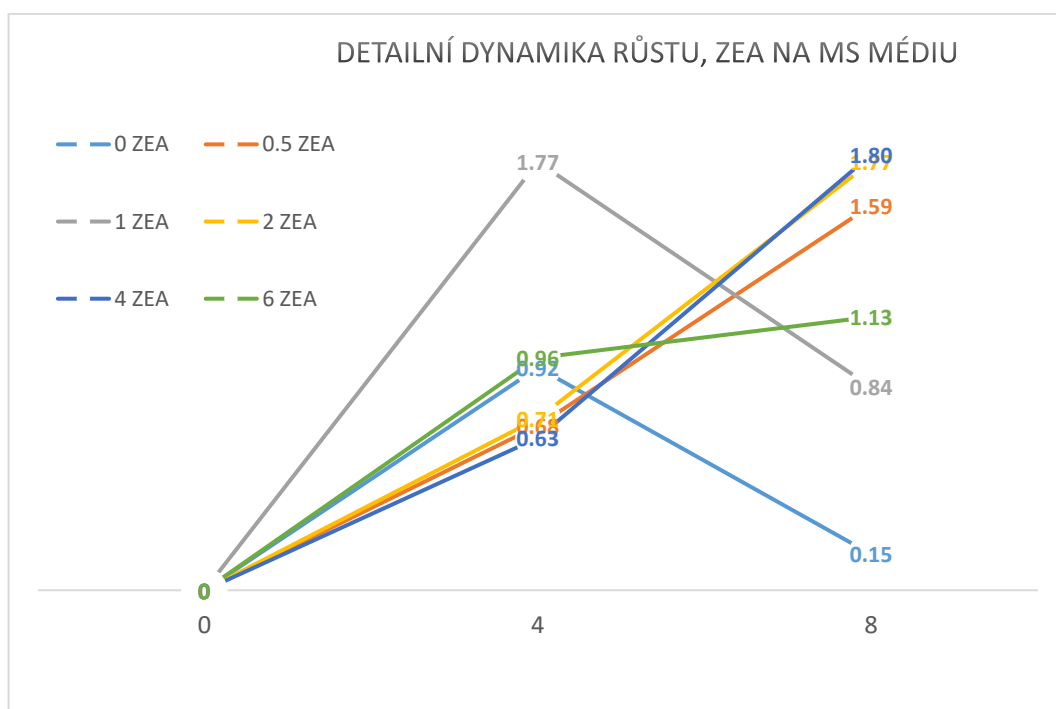
*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Zprůměrované hodnoty růstu rostlin na jednotlivých CTKN vykazují lineární růst rostlin pro BAP, KIN a ZEA po dobu celých 8 týdnů, nadprůměrnou dynamiku v prvních 4 týdnech lze doložit u TDZ. Mezi 4 a 8 týdnem však tato dynamika klesá, tudíž rostliny s CTKN TDZ rostly v druhé polovině pokusu znatelně pomaleji, než tomu bylo v polovině první. Protože jsou však data v tomto grafu zkrácená průměrem všech koncentrací, následují detailní grafy BAP a ZEA po jednotlivých koncentracích CTKN.



**Graf 13: Detailní růstová dynamika na MS médiu dle koncentrací BAP**

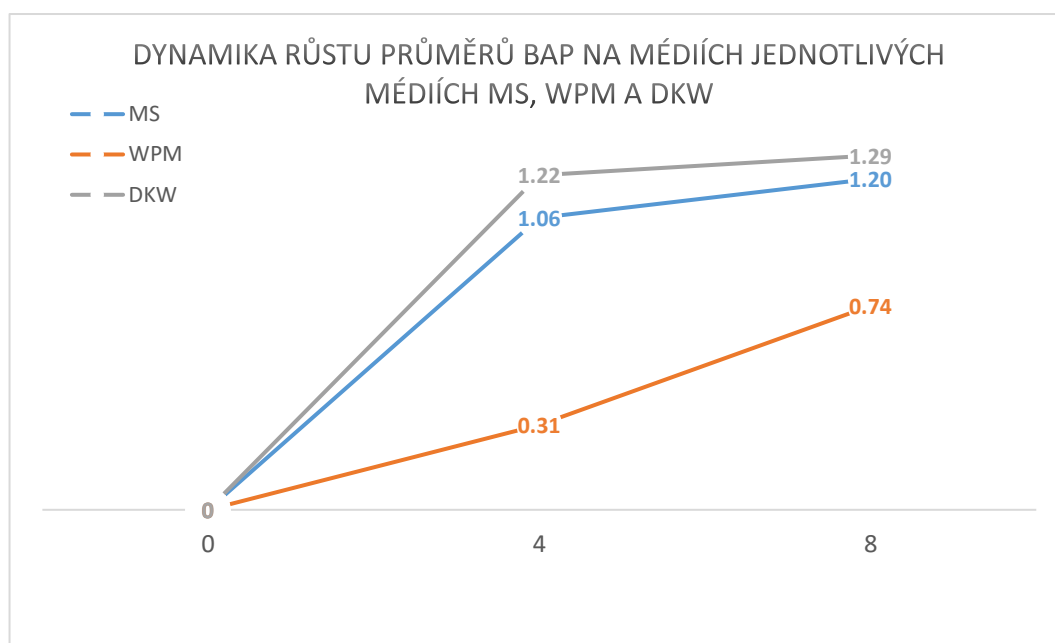
*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 14: Detailní růstová dynamika na MS médiu dle koncentrací ZEA**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

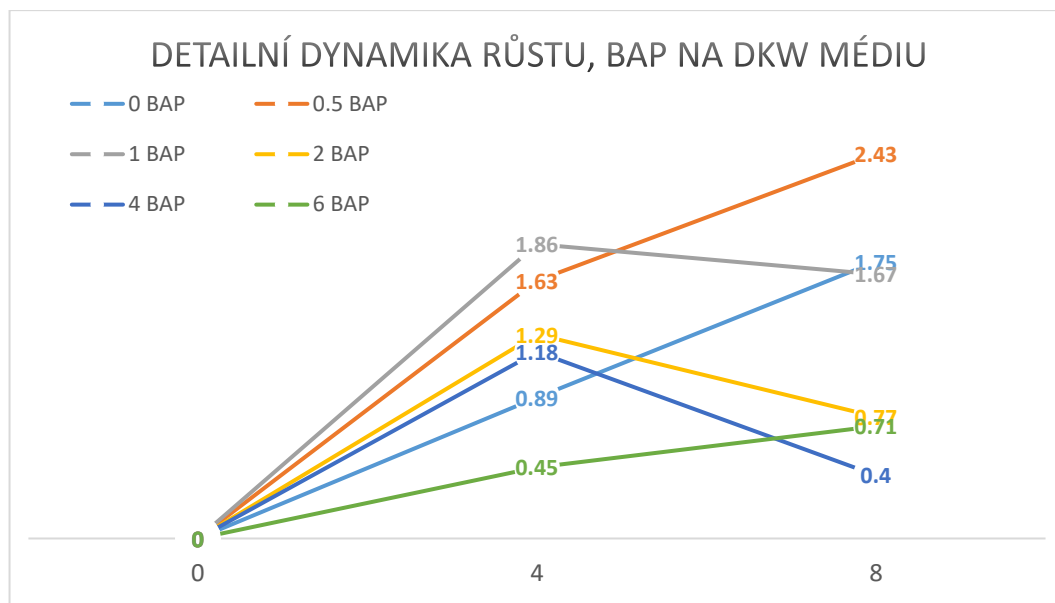
### 3.2.2 Dynamika růstu průměrů koncentrací BAP na MS, WPM a DKW médiu



**Graf 15: Růstová dynamika zprůměrovaných BAP na MS, WPM a DKW médiu**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z tohoto grafu jednoznačně vyplývá, že růst rostlin na koncentracích BAP na médiích DKW a MS jsou v prvních 4 týdnech velmi dynamické a mezi 4 a 8 týdnem tato dynamika klesá, téměř lineární růst na WPM ukazuje stabilní růst po celou dobu pokusu, ale výsledkově nedosahuje hodnot rostlin na prvních dvou médiích. Protože jsou však data v tomto grafu zkrácena průměrem všech koncentrací následuje detailní graf BAP na médiu DKW, graf BPA na médiu MS (viz Graf 13).



**Graf 16: Detailní růstová dynamika na DKW médiu dle koncentrací BAP**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

### 3.3 Výsledky kořenění

Zpracované výsledky dílčích pokusů tvorby kořínků zahrnují tabulkové, grafické a textové shrnutí.

#### 3.3.1 Výsledky kořenění rostlin s vybranými koncentracemi IBA, IAA a NAA na ½ MS média

V návaznosti na původní bakalářskou práci (Švagr, 2019), kde bylo testováno kořenění explantátů s přidáním AUXN IBA a NAA, bylo zvoleno použití ve stejných podmínkách AUXN IAA, opět v koncentracích 0 až 1.6 mg.l<sup>-1</sup> ½ MS média s přidáním vitamíny a sacharózou (Tab. 8) Poloviční koncentrace MS média stresuje explantáty a jsou tak nuceny k vyšší tvorbě kořínků, aby získaly dostatek živin z živného média. Tento test probíhal v podmínkách kultivační místnosti po dobu 8 týdnů bez přesazování na čerstvé médium pro 20 rostlinek primární testovací sady a 20 rostlinek sady kontrolní.

Sledovanými parametry tvorby kořínků byl průměrný počet a délka vytvořených kořínků a procentuální úspěšnost kořenění rostlin v jednotlivých koncentracích AUXN přidávaných ½ MS média po 8 týdnech od zahájení pokusu. Analýza rozptylu



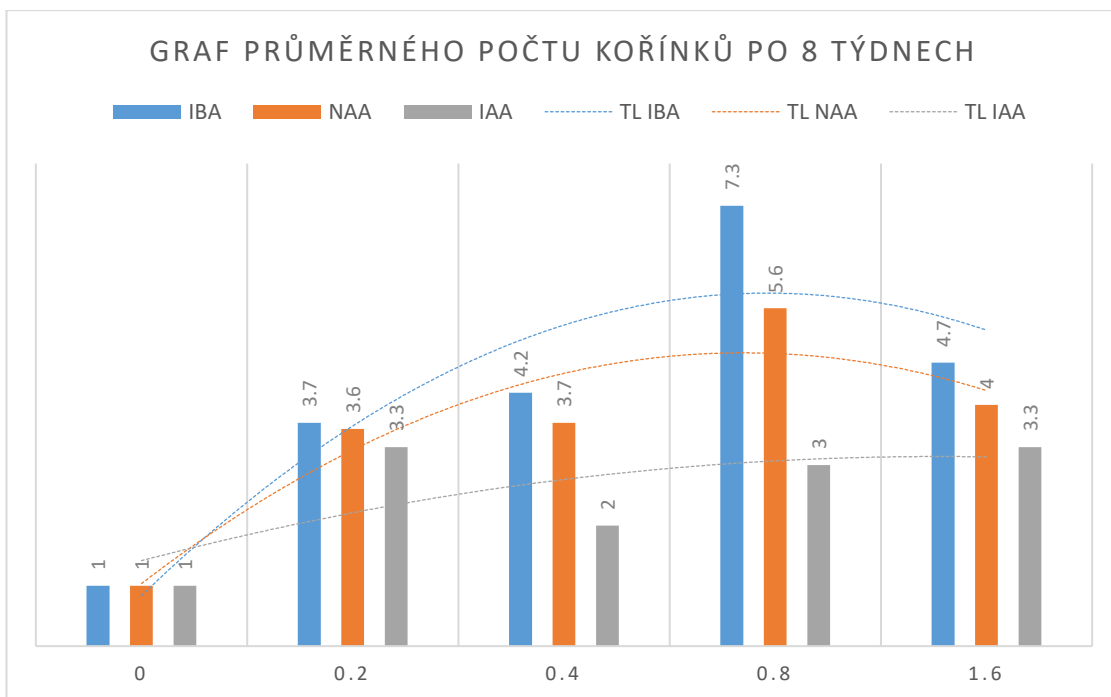
naměřených hodnot primární a kontrolní sady rostlin pro stejné koncentrace AUXN na hladině významnosti 0.05 nevykazuje významný rozdíl mezi sadami a lze tvrdit, že oba vzorky vykazují stejné nebo zanedbatelně nízké rozdíly výsledků.

**Tabulka 8: Sumární tabulka tvorby kořínků**

Auxin	Koncentrace mg/l	Úspěšnost kořenění %	Počet kořínků ks	Délka kořínků cm	Hodnocení
REF	0	10	1	1	DDD
I	0.2	60.0	3.7	6.7	ACB
B	0.4	45.0	4.2	8.5	BAB
A	0.8	17.5	7.3	7.5	CAA
	1.6	25.0	4.7	6.8	BBB
N	0.2	17.5	3.6	6.1	CBC
A	0.4	32.5	3.7	8.1	BCA
A	0.8	22.5	5.6	7.9	CAA
	1.6	7.5	4.0	3.2	DBD
I	0.2	7.0	3.3	6.2	DCB
A	0.4	43.0	2.0	4.5	BDC
A	0.8	24.0	3.0	5.7	CCC
	1.6	50.0	3.3	6.7	ACB

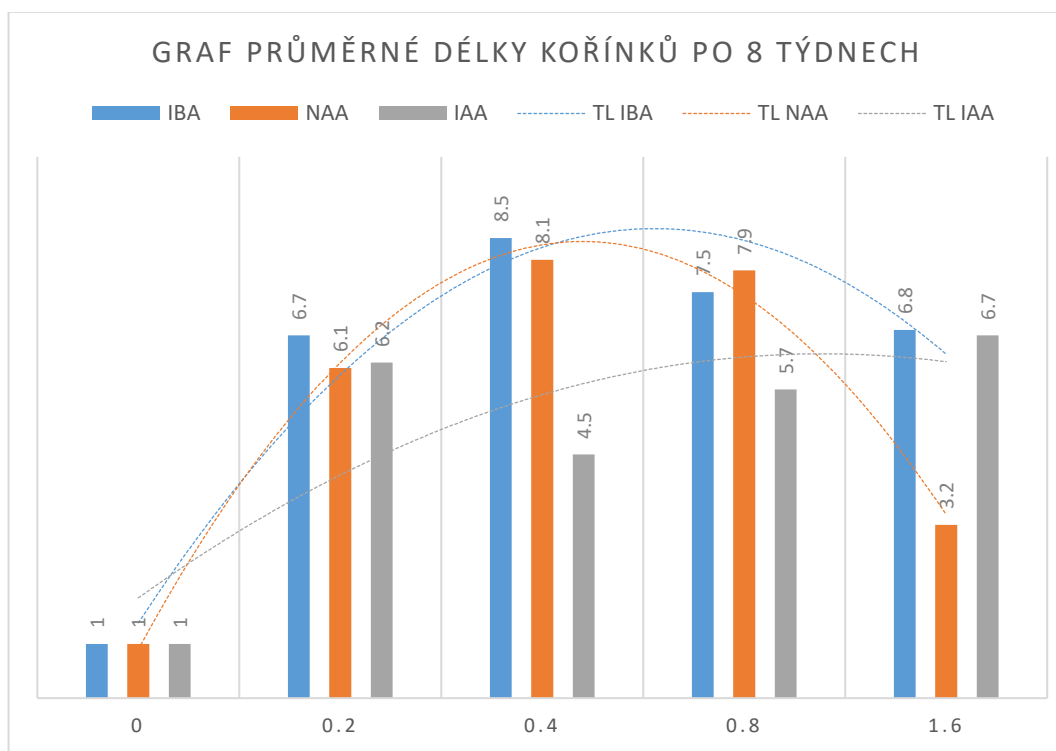
	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 17: Graf průměrného počtu kořínků po 8 týdnech na různých koncentracích a typech AUXN**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Graf 18: Graf průměrné délky kořínků po 8 týdnech na různých koncentracích a typech AUXN**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Pro fázi hodnocení kořenění na jednotlivých AUXN je nejdůležitějším znakem výše procentuálního kořenění rostlinek. V tomto bodě lze pozitivně hodnotit 0.2 v 0.4 mg.l<sup>-1</sup> IBA a 0.4 v 1.6 IAA, ale nejvyšší stejné skóre v hodnocení (ACB) obdržely koncentrace 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA a 1.6 mg.l<sup>-1</sup> IAA a porovnáním hodnot doplňkových ukazatelů (průměrný počet a délka kořínků) lze doporučit k zakořeňování *Morus nigra* v *in vitro* podmínkách ½ MS médium s přidáním 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA.

### 3.3.2 Výsledky temnostní fáze na kořenění rostlin s vybranými koncentracemi IBA na ½ MS média

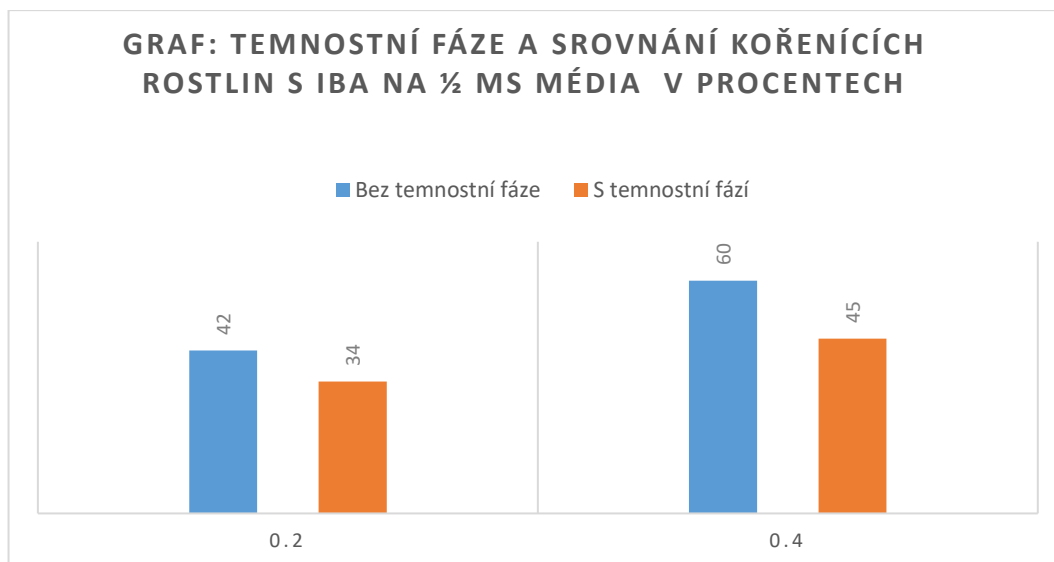
Na dvou koncentracích úspěšně kořenících AUXN IBA v koncentraci 0.2 a 0.4 mg.l<sup>-1</sup> na 1/12 MS média byl testován vliv temnostní fáze, která probíhala po dobu deseti dnů od nasazení kultury, poté byly sklenice s rostlinami umístěny standardně na policový systém kultivační místnosti pod světelný zdroj. Hodnota „0“ v tabulce znamená, že pokus proběhl bez temnostní fáze, hodnota „1“, že pokus proběhl s temnostní fází.

**Tabulka 9: Hodnocení kořenění IBA na ½ MS s temnostní fází**

Auxin	Temnostní fáze	Koncentrace mg/l	Úspěšnost kořenění %	Počet kořínků ks	Délka kořínků cm	Hodnocení
REF	0	0	10	1	1	DDD
I	0	0.2	60	3.7	6.7	ACB
B	0	0.4	45	4.2	8.5	BAB
A	1	0.2	42	2.1	5.2	BDC
	1	0.4	34	2.4	4.4	BDC

	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel



**Graf 19: % kořenění rostlin na ½ MS médiu s IBA a temnostní fází**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z výsledků vyplývá, že temnostní fáze neměla pro růst kořínků MN v těchto podmínkách pozitivní vliv a nezvýšila se úspěšnost kořenění nebo počty a délky kořínků. Všechna růstová data oproti testům bez temnostní fáze poklesla a tuto metodu nelze doporučit pro kořenění MN v *in vitro* podmínkách.

### **3.3.3 Výsledky vlivu temnostní fáze kořenění na ½ MS médiu s různou koncentrací AC**

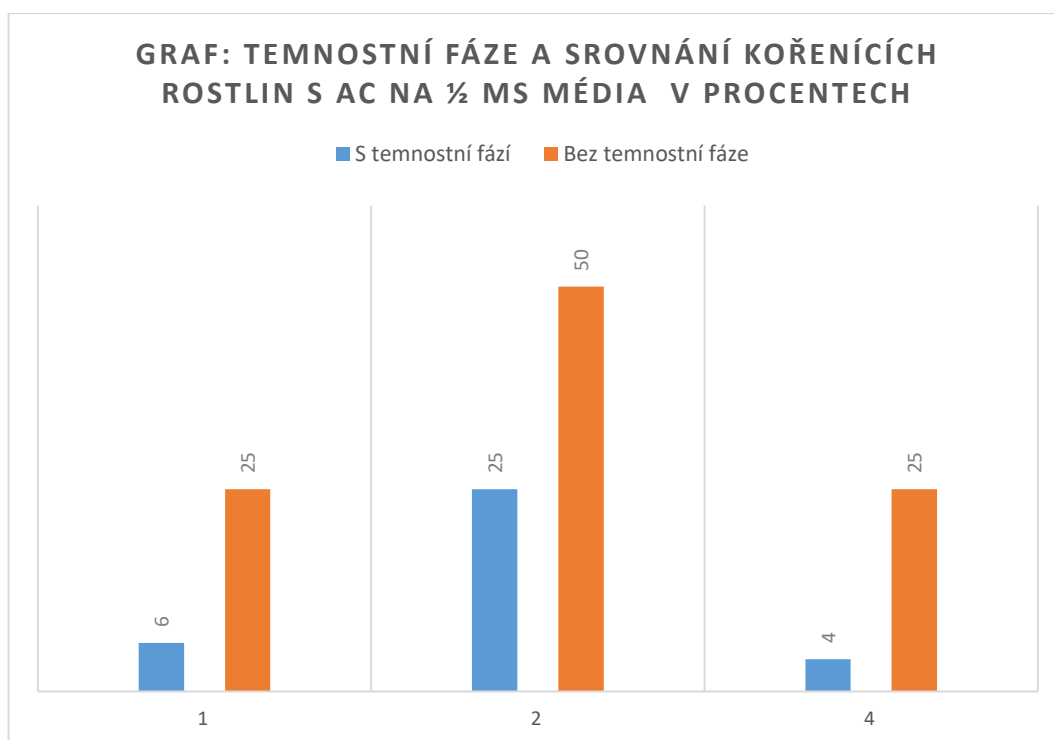
Hodnota „0“ v tabulce znamená, že pokus proběhl bez temnostní fáze, hodnota „1“, že pokus proběhl s temnostní fází.

**Tabulka 10: Hodnocení kořenění AC na ½ MS s temnostní fází**

Organika	Temnostní fáze	Koncentrace mg/l	Úspěšnost kořenění %	Počet kořínků ks	Délka kořínků cm	Hodnocení
REF	0	0	10	1	1	DDD
	0	1	25	3.2	4.1	BCC
	0	2	50	3.7	5.2	ACC
A	0	4	25	3.2	3.7	BCC
C	1	1	6	2	2.8	DDD
	1	2	25	2.5	3.5	BCD
	1	4	4	2	2.1	DDD

	Nejlepší výsledek dílčího pokusu
	Nejlepší výsledek varianty pokusu
	Nejhorší výsledek dílčího pokusu

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

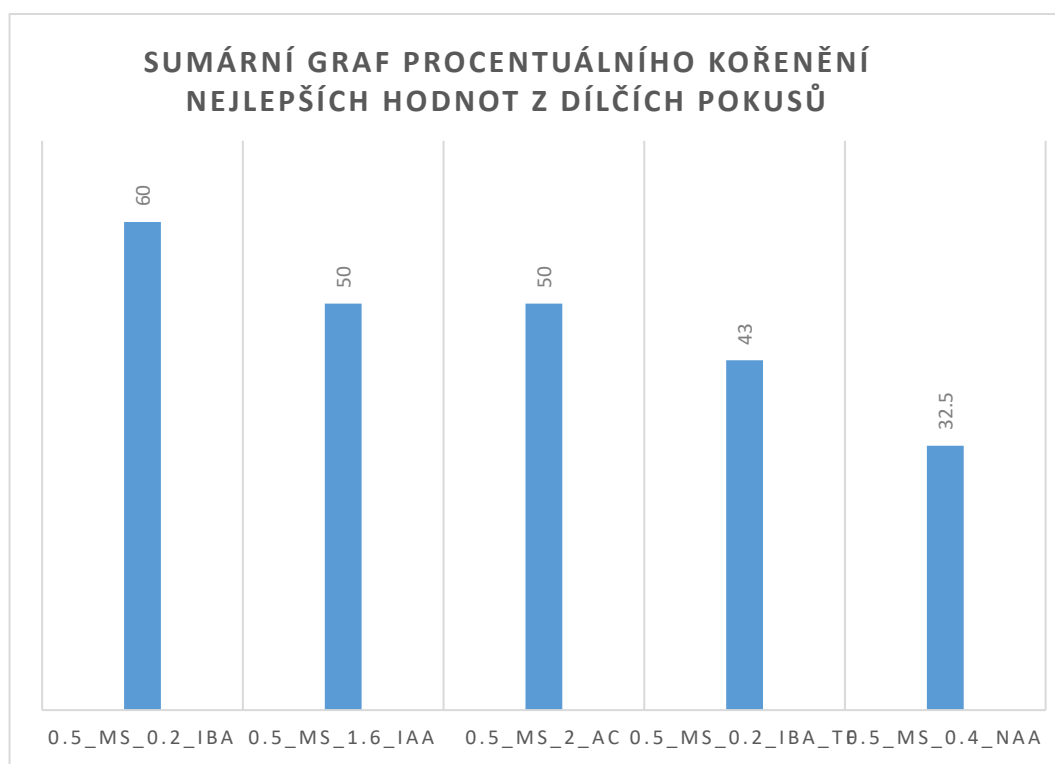


**Graf 20: % kořenění rostlin na ½ MS médiu s přidáním AC v koncentracích 1, 2 a 4 mg.l<sup>-1</sup>**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z výsledků vyplývá, že temnostní fáze neměla pro růst kořínků MN pozitivní vliv, rostlinky bez temnostní fáze kořenili lépe a srovnáním s referenční hodnotou bylo dosaženo jak vyšší hodnoty kořenění (50%) tak vyšších hodnot délky a počtu nových kořínků. Velmi kladný vliv mělo použití AC na míru vitrifikace a kalusu (0%).

### 3.3.4 Celkové grafické srovnání dat nejlépe hodnocených dílčích pokusů pro kořenění



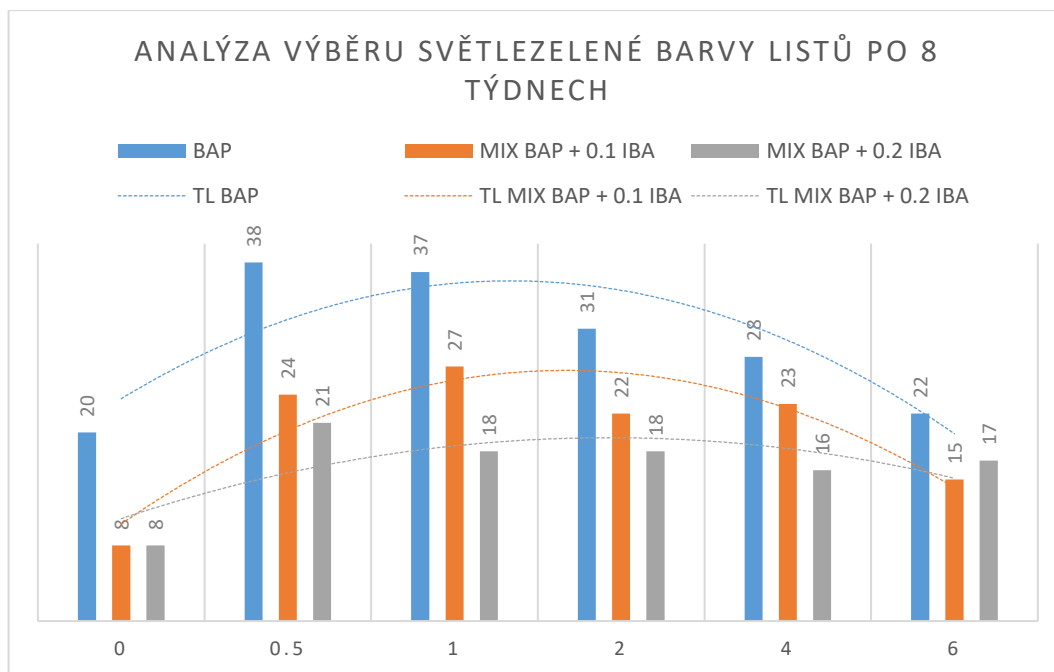
Graf 21: Celkové srovnání dat dílčích pokusů kořenění

Zdroj: Vlastní zdroj, Excel

### 3.4 Výsledky výběrové analýzy barvy listů

V tomto testu byla hodnocena získaná data světlezelené barvy listů explantátů na různých koncentracích CTKN BAP s 0 ∨ 0.1 ∨ 0.2 IBA v testech MIX a porovnávána s grafem růstu a multiplikace prýtů (viz Graf 8, Graf 9)

Hypotéza: Graf počtů světlezelené barvy listů koresponduje grafem průměrné výšky rostlin. Světlezelená barva zdravých listů vypovídá o množství chlorofylu, fotosyntetické aktivitě a samotné kvalitě vypěstovaných rostlin, stejně jako počty prýtů



**Graf 22: Analýza výběru světlezelené barvy listů po 8 týdnech**

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Srovnáním grafů lze potvrdit hypotézu, že čím jsou rostlinky růstově silnější, tedy jsou vyšší a mají více prýtů, tím je zároveň zaznamenáno vyšší číslo pozorovaných počtů rostlin se zdravými světlezelenými listy po ukončení testů.

### 3.5 Výsledky převodu *ex vitro*

Explantáty, které s přidanými AUXN vytvořily kořínky, posloužili k dalšímu testu kořenění v nesterilním prostředí substrátu a perlitu v květináčích umístěných v umělohmotných minisklenicích s manuálním řízením cirkulace vzduchu a vlhkosti uložené v kultivační místnosti. Odebraným rostlinám byly nejprve zkráceny kořínky na délku 2 až 3 cm a před samotným vysazením byly dokonale propláchnuty v dezinfekčním roztoku destilované vody a hypermanganu. To sloužilo především pro eliminaci zbytků agarů v zapletených kořincích a rostliny byly přesazeny do květináčků se zahradním substrátem nebo perlitem. Hlavními sledovanými výstupními hodnotami převodu *ex vitro* jsou počty rostlin, úspěšnost jejich přežití v nesterilních podmínkách po uplynutí doby 8 týdnů, průměrná výška ve 4 a 8 týdnu od zahájení pokusu. Po 4 a 8 týdnu byl okulárně zkontrolován průstup kořínků rostlin přes spodní otvory květináčků a zaznamenán procentuálně do tabulky. Dále bylo odebráno

po 8 týdnů 5 rostlin rostoucích na perlitu a 5 rostlin rostoucích na substrátu, které byly změřeny a zváženy (viz Tabulka 13)

**Tabulka 11: Převod ex vitro po 4 týdnech**

		Perlit	Substrát
Počet rostlin	(n)	15	15
Živé rostliny po 4 týdnech	(%)	100	100
Průměrná výška 4 týdny	(cm)	4.47 ± 1.57	5.33 ± 3.11
Prostup kořenů dnem květináčků	(%)	66.6	66.6

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z tabulky získaných hodnot převodu *ex vitro* po 4 týdnech vyplývá, že kromě mírně zvýšeného průměru výšky rostlin na komerčním substrátu se rostliny vyvíjely úspěšně na perlitu i substrátu.

**Tabulka 12: Převod ex vitro po 8 týdnech**

		Perlit	Substrát
Počet rostlin	(n)	15	15
Živé rostliny po 8 týdnech	(%)	100	100
Průměrná výška 8 týdnů	(cm)	8.01 ± 1.83	5.66 ± 1.62
Prostup kořenů dnem květináčků	(%)	100	100

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*



**Tabulka 13: Převod ex vitro po 8 týdnech - detail výběru**

	Perlit	Substrát
Počet rostlin (n)	5	5
Průměrná výška (cm)	8.40 ± 0.74	6.38 ± 0.89
Průměrná délka kořenů (cm)	23.78 ± 1.12	18.28 ± 3.76
Váha čerstvé rostliny (g)	14.480	8.683
Váha čerstvé nadzemní části (g)	8.648	4.866
Váha čerstvé kořenové části (g)	5.386	3.992
Váha sušiny nadzemní části (g)	1.346	1.304
Váha sušiny kořenové části (g)	0.448	0.630

*Zdroj: Vlastní zdroj, Excel*

Z tabulky získaných hodnot převodu *ex vitro* po 8 týdnech vyplývá, že růst rostlin na komerčním substrátu se mezi 4 a 8 týdnem téměř zastavil, na perlitu byl naopak velmi dynamický a lze tvrdit, že rostliny rostoucí v perlitu v prvních týdnech mohutně rozvíjeli svůj kořenový systém oproti nadzemní části a teprve potom se aktivoval růst nadzemního patra. Rostliny v perlitu byly viditelně v lepší kondici než rostliny na substrátu, měly široké, světlezelené listy, rostliny na substrátu je měly znatelně menší, trochu povadlé a některé dokonce napadené plísní. V druhé části pokusu tedy růst rostlin v substrátu stagnoval a jako dynamický se projevil u rostlin pěstovaných v perlitu.

Obsah sušiny v nadzemní části rostlin pěstovaných v perlitu tvoří 15.6 %, v substrátu pak 26.8 %, obsah sušiny kořenové části rostlin pěstovaných v perlitu tvoří 8.3 %, v substrátu pak 15.1 %, . Poměr sušiny podzemních a nadzemních částí rostlin je pak téměř shodný pro oba typy substrátů s hodnotou cca 1:2, nižší procenta pak ukazují vyšší nasycenost tkání rostlinek pěstovaných v perlitu.



**Obrázek 14: MN rostoucí na substrátu po 8 týdnech**

*Zdroj: vlastní zdroj*



**Obrázek 15: MN rostoucí na perlitu po 8 týdnech**

*Zdroj: vlastní zdroj*

Roční rostliny z převodu *ex vitro* bakalářské práce (6 ks) pěstované v jednom společném květináči za oknem v domácích podmínkách dosáhly průměrné výšky 13.3 cm v intervalu výšek <7-19> cm (květen 2020).



**Obrázek 16: Roční MN rostoucí v květináči (květen 2020)**

*Zdroj: vlastní zdroj*



**Obrázek 17: Roční MN rostoucí ve skleníku školního podniku Truba (květen 2020)**

*Zdroj: vlastní zdroj*

## 4 Diskuze

### 4.1 Růst a multiplikace prýtů

Pattnaik et al. (1997) doporučuje pro multiplikaci prýtů *Morus cathayana*, *Morus lhou* a *Morus serrata* MS médium obsahující 015 až 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP, v této práci bylo dosahováno lepších výsledků MS médium se 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP a DKW médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP.

V práci Annis et al. (2003) doporučuje pro multiplikaci *Morus alba* MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0.2 mg.l<sup>-1</sup> NAA, Kumari et al. (2012) pak pro *Salvadora persica* MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0.5 mg.l<sup>-1</sup> IAA. Nejlépe hodnocený mix v této práci, tedy MS médium se 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0.1 mg.l<sup>-1</sup> IAA byl výsledkově horší než 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP bez přidaného AUXN.

Zde je nutné podotknout, že Pattnaik et al. (1997) a Aniss et al. (2003) shodně doporučují do média s CTKN přidat nižší koncentrace glutaminu, který je pro rostliny jako zdroj dusíku zřejmě velmi vhodnou látkou, což samostatným testem s glutaminem bylo zjištěno i v této práci.

Doporučení z práce Medková (2013), tedy použití WPM média a 1 mg.l<sup>-1</sup> MT je v rozporu s výsledky této práce. Nelze rozporovat použití topolinu, ale při růstu rostlin na WPM médiu s různými koncentracemi BAP v této práci, bylo dosaženo velmi slabých výsledků oproti růstu rostlin na médiích DKW a MS.

Tewari et al. (1999) hodnotili pro *Morus multicaulis*, *Morus indica* kladně použití MS média s 0.1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ pro růst, 0.5 mg.l<sup>-1</sup> TDZ pro multiplikaci prýtů a 2.5 mg.l<sup>-1</sup> BAP pro *Morus multicaulis*. Lze se shodnout na použití této koncentrace BAP, ale z výsledků vyplývá, že všechny použité koncentrace TDZ dosahovaly v této práci nižších hodnot růstu a multiplikace prýtů než přidání BAP.

Attia et al.(2014) pro *Morus alba* a Mehbooba et al. (2011) pro *Morus nigra* doporučují k růstu a multiplikaci prýtů MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP respektive 5 mg.l<sup>-1</sup> BAP, což se shoduje s výsledky v této práci, kde je BAP doporučován, ačkoli další testy prokázaly, že ještě vyšších výnosů lze dosáhnout při použití DKW média.

Stejně nelze rozporovat použití MS média s 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP pro *Spondias magnifera* Tripathi et al. (2010), CTKN BAP byl kladně hodnocen i v této diplomové práci.

Valizadehkaj et al. (2013) doporučují pro *Punica granatum* 1 a 2 mg.l<sup>-1</sup> Kn na WPM médiu a tento výsledek je v rozporu s výsledky v této práci. WPM médium dosahovalo velmi podprůměrných výsledků oproti použití jiných živných půd a různých koncentrací CTKN.

Výzkum s různými koncentracemi sacharózy v práci Sharma et al. (2012) u *Acacia leucophloea* potvrdil, že je vhodné používat koncentraci 30 mg.l<sup>-1</sup> sacharózy, ovšem nelze srovnat jejich způsob použití CTKN, které nebyly přidávány do živného média, ale rostlinky byly pouze ponořovány do různých koncentrací CTKN po dobu několika minut a následně umísťovány do MS média. Zajímavé je, že vysokou míru kalusu takto testovaných rostlin snížili přidáním 2 mg.l<sup>-1</sup> AC do média, což potvrzují i výsledky použití AC v této práci, kdy byly výsledky kalusu a vitrifikace nulové.

Tato práce pro výškový růst explantátů doporučuje použití DKW média bez přidaného CTKN, kdy průměrná výška dosáhla 4,56 cm, s 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP byla průměrná výška 3,34 cm a s 1 mg.l<sup>-1</sup> ZEA pak 3,11 cm. Pro multiplikaci prýtů lze doporučit MS médium se s 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP a průměrným počtem nových prýtů 6,28 a DKW s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP průměrným počtem nových prýtů 5,54.

## 4.2 Tvorba kořenů a aklimatizace

Pattnaik et al. (1997) pro *Morus cathayana*, *Morus lhou* a *Morus serrata* doporučují pro úspěšné zakořeňování explantátů ½ MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> IAA v IBA v NAA, Annis et al. (2003) pro *Morus alba* ½ MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, Aroonpong et al. (2015) pro *Morus alba* ½ MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> IBA, dle Pancho et al. (2018) pro *Morus sp.* MS médium s 0.25 v 1 mg.l<sup>-1</sup> IAA v NAA, Medková (2013) pro *Morus nigra* ½ MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> CEP, Gogoi et al. (2016) pro *Morus indica* ½ MS médium s 5 mg.l<sup>-1</sup> AC a 0.5 mg.l<sup>-1</sup> NAA, Yadav et al. (1990) pro *Morus nigra* ½ MS médium s 0.25 v 1 mg.l<sup>-1</sup> IBA v IAA v NAA, Chitra et al. (1998) pro *Morus indica* 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D a takto namnožené rostliny úspěšně aklimatizovat přenosem do zahradního substrátu.

Tewari et al. (1999) shrnuje pro *Morus multicaulis* a kultivary K2, RFS175, SI *Morus indica*, že zakořeňování morušovníků *in vitro* se významně zlepšilo přidáním aktivního uhlí do kultivačního média. Významné zvýšení procenta zakořeňování a snížení dnů potřebných pro zakořeňování bylo pozorováno použitím 0.05% aktivního

uhlí pro *Morus multicaulis* a *Morus indica* kultivaru S1 a hodnoty 0.1% aktivního uhlí pro *Morus indica* kultivarů K2 a RFS175. Všechny rostliny pěstované *in vitro* byly úspěšně aklimatizovány a přeneseny do zahradního substrátu bez stanoveného procenta úspěšně přeživších jedinců.

Kořenění metodou *in vitro* bylo zkoumáno v práci Sharma et al. (2012) u *Acacia leucophloea* na  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{4}$  MS a výsledky jasně prokazují úspěšné použití koncentrace  $\frac{1}{2}$  MS, dále zkoumali vliv různých koncentrací sacharózy 0 až  $50 \text{ g.l}^{-1}$ , kde byly nejlepší výsledky získány při koncentraci  $30 \text{ g.l}^{-1}$ , dále pak bylo testováno ponořením explantátů do různých koncentrací 1 až  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA po dobu deseti minut a přenos do MS média, kde z hlediska procentuálního růstu kořenů doporučují použít koncentraci  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA, pro délku a počet kořenů pak  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA, problém na všech těchto koncentracích byla vysoká míra kalusu, který eliminovalo v dalším pokusu přidání různých koncentrací  $0.5$  až  $5 \text{ g.l}^{-1}$  AC do MS média, kde k jasně nejlepšímu výsledku vedlo použití  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  AC, ale všechny koncentrace AC dokázaly tvorbu kalusu snížit.

Výsledky této diplomové práce doporučují pro vysoké procentuální kořenění  $\frac{1}{2}$  MS médium s  $0.2 \vee 0.4 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA,  $\frac{1}{2}$  MS médium s  $1.6 \vee 0.4 \text{ mg.l}^{-1}$  IAA a  $\frac{1}{2}$  MS médium s  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  AC bez temnostní fáze. Z hlediska délky kořínků je vhodné použití  $\frac{1}{2}$  MS médium s  $0.4 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA  $\vee 0.4 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA, pro jejich počet pak  $\frac{1}{2}$  MS médium  $0.8 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA  $\vee 0.8 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA. Pro přenos *ex vitro* je vhodné rostliny nejprve umístit po dobu 1 měsíce do květináčků s perlitem, kde byl zaznamenán velmi dynamický růst, zalévat  $\frac{1}{10}$  koncentrací MS média a poté je přesadit do květináčků se zahradním substrátem a umístěním do fóliovníku nebo skleníku.

## Závěr a shrnutí

Po měsících testování v laboratoři a po zpracování dat lze doporučit k úspěšné mikropropagaci morušovníku černého v laboratorních podmínkách následující média a fytohormony:

- a) pro růst rostlin v intervalu 4 týdnů:
  - **DKW médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP** (alternativně MS médium se 100 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu nebo 1 mg.l<sup>-1</sup> ZEA)
- b) pro růst rostlin v intervalu 8 týdnů:
  - **DKW médium bez CTKN** (alternativně MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP nebo ZEA)
- c) pro multiplikaci prýtů v intervalu 4 týdnů:
  - **MS médium s 0.2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ** (alternativně DKW médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP nebo MS médium s 1 mg.l<sup>-1</sup> ZEA)
- d) pro multiplikaci prýtů v intervalu 8 týdnů:
  - **MS médium s 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP** (alternativně DKW médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> BAP)
- e) pro kořenění a aklimatizaci:
  - **½ MS médium s 0.2 mg.l<sup>-1</sup> IBA** (alternativně ½ MS médium s 1.6 mg.l<sup>-1</sup> IAA nebo ½ MS médium s 2 mg.l<sup>-1</sup> AC )
  - přenos rostlin do perlitu, po měsíci do zahradního substrátu

Jak vyplývá z této diplomové práce, každý druh morušovníku nebo jeho kultivaru vyžaduje specifické podmínky a praktickými testy prozkoumanou metodiku pro jeho úspěšné množení v *in vitro* podmínkách, každý druh potřebuje jinou podporu a skladbu jak živného média, tak přidaných fytohormonů a organických látek. Doufám, že tato práce přispěje svými závěry k možnému úspěšnému klonování vhodných a kvalitních ovocných stromů *Morus nigra*.

## Přehled literatury a zdrojů

- ANIS M. / FAISAL M. / SINGH S. K., *Micropropagation of Mulberry (Morus alba L.) Through In vitro Culture of Shoot tip and Nodal Explants*, 2003, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/237401795\\_Micropropagation\\_of\\_Mulberry\\_Morus\\_alba\\_L\\_Through\\_In\\_vitro\\_Culture\\_of\\_Shoot\\_tip\\_and\\_Nodal\\_Explants](https://www.researchgate.net/publication/237401795_Micropropagation_of_Mulberry_Morus_alba_L_Through_In_vitro_Culture_of_Shoot_tip_and_Nodal_Explants)
- ATTIA A. / SDESSOKY E. / EL-HALOUS E. / SHAABAN H., 2014,  
*Micropropagation of mulberry (MORUS ALBA L.) CV. AL-TAIFY*, [online]  
[https://www.researchgate.net/profile/Attia\\_Attia2/publication/261711546\\_MICROPROPAGATION\\_OF\\_MULBERRY\\_MORUS\\_ALBA\\_L\\_CV\\_AL-TAIFY/links/0c960535387aeb40ea000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Attia_Attia2/publication/261711546_MICROPROPAGATION_OF_MULBERRY_MORUS_ALBA_L_CV_AL-TAIFY/links/0c960535387aeb40ea000000.pdf)
- AVILES F., RÍOS D., GONZALEZ R., SANCHEZ-OLATE M., *Effect of culture medium in callogenesis from adultwalnut leaves (Juglans regia L.)*, 2009, [online]  
<http://www.bioline.org.br/pdf?cj09055>
- AROONPONG P / CHANG J.Ch., *Micropropagation of a difficult-to-root weeping mulberry (Morus alba var. Shidareguwa): A popular variety for ornamental purposes*, 2014, [online]  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423815301382>
- BIOLOGY Online, 2021, [online]  
<https://www.biologyonline.com>
- CHITRA D.S.V / PADMAJA G., *Clonal propagation of mulberry (Morus indica L. cultivar M-5) through in vitro culture of nodal explants*, 1998, [online]  
[https://www.semanticscholar.org/paper/Clonal-propagation-of-mulberry-\(Morus-indica-L.-in-Chitra-Padmaja/9099f9ba823f158b83f02185b79daebcd3ab2388](https://www.semanticscholar.org/paper/Clonal-propagation-of-mulberry-(Morus-indica-L.-in-Chitra-Padmaja/9099f9ba823f158b83f02185b79daebcd3ab2388)
- CHUTIPAJIT S. / SUTJARITVORAKU T., *Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (Oryza sativa L.)*, 2018, [online]  
<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09542299.2017.1418184>



- DEL POZO J. C. / DIAZ-TRIVINO S. / CISNEROS N. / GUTIERREZ C.,  
*The E2FC-DPB transcription factor controls cell division, endoreplication  
and lateral root formation in a SCFSKP2A-dependent manner*, 2007, [online]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634164/>
- FRÉBORT I. / KOWALSKA M. / HLUSKA T. / FRÉBORTOVÁ J. / GALUSZKA  
P., *Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation*, 2011, [online]  
<https://academic.oup.com/jxb/article/62/8/2431/479405>
- GOGOI G. / BORUA P. / AL-KHAIRY J.,(2017), *Improved micropropagation  
and in vitro fruiting of Morus indica L. (K-2 cultivar)*, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/315349386\\_Improved\\_micropropagation\\_and\\_in\\_vitro\\_fruiting\\_of\\_Morus\\_indica\\_L\\_K-2\\_cultivar](https://www.researchgate.net/publication/315349386_Improved_micropropagation_and_in_vitro_fruiting_of_Morus_indica_L_K-2_cultivar)
- LACOMBE B. / ACHARD P., *Long-distance transport of phytohormones through  
the plant vascular system*, 2016, [online]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340874>
- LEFNAR R., *Mechanism of auxin transport across plasma membrane through PIN  
auxin efflux carriers*, 2017 [online] <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/116810/>
- JURČÁK J., *Komentovaný atlas anatomie vyšších rostlin*, 2007, ISBN 80-86376-  
39-7
- KOBERCOVÁ E., *Glutamin syntetázy a jejich role v metabolismu dusíku v prýtu  
rostlin*, 2014, [online] <http://hdl.handle.net/20.500.11956/68718>
- KONEČNÝ T., *Úloha auxinu a cytokininu v organogenezi Arabidopsis thaliana*,  
2015, [online] [https://is.muni.cz/th/k34ew/Bakalarska\\_prace\\_TK.pdf](https://is.muni.cz/th/k34ew/Bakalarska_prace_TK.pdf)
- KUMARI S. / SINGH N., *In vitro plantlet regeneration from cotyledonary node  
explants of Salvadora persica L. a medicinally important desert tree*, 2012.,  
[online]  
[https://www.researchgate.net/publication/266508063\\_In\\_vitro\\_plantlet\\_regeneration\\_from\\_cotyledonary\\_node\\_explants\\_of\\_Salvadora\\_persica\\_L\\_a\\_medically\\_important\\_desert\\_tree](https://www.researchgate.net/publication/266508063_In_vitro_plantlet_regeneration_from_cotyledonary_node_explants_of_Salvadora_persica_L_a_medically_important_desert_tree)

- KURAKAWA T. / UEDA N. / MAEKAWA M. / KOBAYASHI K. / KOJIMA M. / NAGATO Y. / SAKAKIBARA H. / KYOZUKA J., *Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme*, 2007, [online] <https://www.nature.com/articles/nature05504>
- MEDKOVÁ M., *Vliv různých druhů cytokininů na zakořeňování moruše černé in vitro*, 2013 [online] <https://socv2.nidv.cz/archiv35/getWork/hash/0734f0a4-915a-11e2-b1f8-faa932cbcfda>
- MEHBOOBA Z. / ZAHOOR A. / SHAFI M., *Micropropagation of Morus nigra L. From Nodal Segments with Axillary Buds*, 2011, [online] <https://pdfs.semanticscholar.org/afbc/b9d6d505c11fc33e6b4ca2139b90570c2b8f.pdf>
- NEPAL M. P. / FERGUSON C.J., *Phylogenetics of Morus (Moraceae) Inferred from ITS and trnL-trnF Sequence Data*, 2012, [online] <http://www.bioone.org/doi/full/10.1600/036364412X635485>
- PANCHO V. / ANEGELICA R., *Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro de morera (Morus sp.) para el suministro de material de siembra en la cadena serícola en el departamento del Cauca-Colombia*, 2018, [online] [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/6912š.š.019-Rosa\\_Angelica\\_Viquez\\_Pancho.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/6912š.š.019-Rosa_Angelica_Viquez_Pancho.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- PARK J. / LEE Y. / MARTINOIA E. / GEISLER M., *Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know*, 2017, [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5655956>
- PATTNAIK S.K / CHAND P.K., *Rapid clonal propagation of three mulberries, Morus cathayana Hemsl., M. Ihou Koiz. and M. serrata Roxb., through in vitro culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees*, 1997, [online] <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01092774>
- PETRÁŠEK J. / FRIML J., *Auxin transport routes in plant development*, 2009, [online] <https://dev.biologists.org/content/136/16/2675>
- PRATCHETT T., *Dámy a pánové*, 1992, ISBN 80-7197-103-0, str. 277

- PUKYSOVÁ V., *Studium interakcí auxinu acytokininu při vývoji laterálních kořenů u Arabidopsis thaliana*, 2016, [online]  
[https://is.muni.cz/th/kc81v/Verejna\\_cast\\_DP\\_Pukysova.pdf](https://is.muni.cz/th/kc81v/Verejna_cast_DP_Pukysova.pdf)
- ROMANOV G.A. / AKSENOVA N.P. / KONSTANTINOVA T.N. / GOLYANOVSKAYA S.A. / KOSSMANN J. / WILLMITZER L., *Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato in vitro*, 2000, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/226153311\\_Effect\\_of\\_indole-3-acetic\\_acid\\_and\\_kinetin\\_on\\_tuberisation\\_parameters\\_of\\_different\\_cultivars\\_and\\_transgenic\\_lines\\_of\\_potato\\_in\\_vitro](https://www.researchgate.net/publication/226153311_Effect_of_indole-3-acetic_acid_and_kinetin_on_tuberisation_parameters_of_different_cultivars_and_transgenic_lines_of_potato_in_vitro)
- SCHENKOVÁ K., *Vliv látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostlin za standardních a stresových podmínek*, 2016, [online]  
[https://theses.cz/id/a6cqgk/schenkova\\_kristyna\\_bakalarska\\_prace.pdf](https://theses.cz/id/a6cqgk/schenkova_kristyna_bakalarska_prace.pdf)
- SHARMA P.K. / TRIVEDI R. / PUROHIT S.D., *Activated charcoal improves rooting in in vitro-derived Acacia leucophloea shoots*, 2012, [online]  
[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/AAJPSB\\_6\(SI1\)/AAJPSB\\_6\(SI1\)47-50o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2012/AAJPSB_6(SI1)/AAJPSB_6(SI1)47-50o.pdf)
- SIGMAALDRICH, *Classical Plant Media Formulations*, 2021, [online]  
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/classic-plant-media.html>
- SONG J. / SHI L. / LI D. / SUN Y. / NIU Y. / CHEN Z. / LUO H. / PANG X. / SUN Z. / LIU C. / LV A. / DENG Y. / LARSON-RABIN Z. / WILKINSON M. / Chen S., *Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA*, 2012, [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431384/>
- SU YING-HUA / LIU YU BO / ZHANG XIAN-SHENG, *Auxin-Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development*, 2011, [online]  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205214606870>

- ŠVAGR P., *Vliv 6-benzylaminopurinu a kyselin indol-3-máselné a 1-naftyloctové na tvorbu adventivních prýtů a kořenů u Morus nigra L. v in vitro podmínkách*, 2019, [online]  
[https://is.czu.cz/auth/lide/clovek.pl?zalozka=7;id=182321;studium=204855;zp=243674;download\\_prace=1](https://is.czu.cz/auth/lide/clovek.pl?zalozka=7;id=182321;studium=204855;zp=243674;download_prace=1)
- TEWARI A. / BHATNAGAR S. / KHUTRANA P., *In Vitro Response of Commercially Valuable Cultivars of Morus Species to Thidiazuron and Activated Charcoal*, 1999, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/276038101\\_In\\_Vitro\\_response\\_of\\_commercially\\_valuable\\_cultivars\\_of\\_Morus\\_species\\_to\\_thidiazuron\\_and\\_activated\\_charcoal](https://www.researchgate.net/publication/276038101_In_Vitro_response_of_commercially_valuable_cultivars_of_Morus_species_to_thidiazuron_and_activated_charcoal)
- TRIPATHI M. / KUMARI N., *Micropropagation of a tropical fruit tree Spondias mangifera Willd. through direct organogenesis*, 2010, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/226276741\\_Micropropagation\\_of\\_a\\_tropical\\_fruit\\_tree\\_Spondias\\_mangifera\\_Willd\\_through\\_direct\\_organogenesis](https://www.researchgate.net/publication/226276741_Micropropagation_of_a_tropical_fruit_tree_Spondias_mangifera_Willd_through_direct_organogenesis)
- TYLOVÁ E., *Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze*, 2020, [online]  
[http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika\\_fr/mb130p13/navody/9\\_fototropismus.pdf](http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/edmunz/praktika_fr/mb130p13/navody/9_fototropismus.pdf)
- VALIZADEHKAJI B. / ERSHADI A. / TOHIDFAR M., *In vitro propagation of two Iranian commercial pomegranates (Punica granatum L.) cvs. 'Malas Saveh' and 'Yusef Khani'*, 2013, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/257779872\\_In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_two\\_Iranian\\_commercial\\_pomegranates\\_Punica\\_granatum\\_L\\_cvs\\_'Malas\\_Saveh'\\_and\\_'Yusef\\_Khani'](https://www.researchgate.net/publication/257779872_In_vitro_propagation_of_two_Iranian_commercial_pomegranates_Punica_granatum_L_cvs_'Malas_Saveh'_and_'Yusef_Khani')
- VIETEN A. / SAUER M. / BrEwer P.B. / FRIML J., *Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development*, 2007, [online]  
[https://www.researchgate.net/publication/6438526\\_Vieten\\_A\\_Sauer\\_M\\_Brewer\\_P\\_B\\_Friml\\_J\\_Molecular\\_and\\_cellular\\_aspects\\_of\\_auxin-transport-mediated\\_development\\_Trends\\_Plant\\_Sci\\_12\\_160-168](https://www.researchgate.net/publication/6438526_Vieten_A_Sauer_M_Brewer_P_B_Friml_J_Molecular_and_cellular_aspects_of_auxin-transport-mediated_development_Trends_Plant_Sci_12_160-168)

YADAV U. / LAL M. / JAISWAL V.S., Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees, 1990, [online]

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304423890900179>

ZAŽÍMALOVÁ E. / PETRÁŠEK J. / MALÍNSKÁ K., *Auxin transportes controlling plant development*, 2010, [online]

[https://www.researchgate.net/publication/226832885\\_Auxin\\_Transporters\\_Controling\\_Plant\\_Development](https://www.researchgate.net/publication/226832885_Auxin_Transporters_Controling_Plant_Development)

## Přílohy

### Příloha I: Program R, vstup/výstup a zamítnutí hypotézy o dvou hodnotově stejných sadách dat

```
1 zea_8_1 <- c(3,3.5,3,2.5,4,2.5,3)
2 zea_8_2 <- c(8,13,14,13,13.5,12,12.5)
3 t.test(zea_8_1, zea_8_2, var.equal = TRUE)
```

```
Two Sample t-test

data: zea_8_1 and zea_8_2
t = -11.792, df = 12, p-value = 5.872e-08
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.91675  -7.51182
sample estimates:
mean of x mean of y
 3.071429 12.285714
```

*Zdroj: Vlastní zdroj*

Jednotlivé sady dat růstu se od sebe již na první pohled liší a v tomto případě je p-value řádově menší než 0.05. Lze konstatovat, že hypotéza nulového rozdílu variability neplatí a obě sady dat jsou rozdílné.