



**Záchrana genofondu vybraných starých odrůd růží  
z areálu Flora Olomouc množením *in vitro***  
Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
Dr. Ing. Helena Fišerová

*Vypracovala:*  
Pavla Remerová



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Pavla Remerová**  
Studijní program: Agrobiologie  
Obor: Biotechnologie rostlin  
Konzultant: Ing. Martin Vlasák, Ph.D.  
Název tématu: **Záchrana genofondu vybraných starých odrůd růží z areálu Flora Olomouc pomocí množení in vitro**  
Rozsah práce: 40

Zásady pro vypracování:

1. Vzhledem k tomu, že areál Rozária výstaviště Flora Olomouc má projít rozsáhlou rekonstrukcí, je žádoucí zvláště cenné odrůdy růží převést do podmínek in vitro pro následné uchování materiálu v genobance.  
Posluchačka se seznámí se systémem členění rodu ROSA (Rehder, Krussman, Kordes, ...) a zejména se starými hybridy tzv. botanických růží se zřetelem na sbírku v areálu Flora Olomouc. Zpracuje literární rešerži způsobu množení in vivo a in vitro a prostuduje průběh dormance u vybraných odrůd.
2. Posluchačka založí primární kulturu in vitro 5 vybraných odrůd růží z axilárních pupenů ve třech etapách odběru v závěru dormance rostlin a bude testovat nejvhodnější média a koncentrace růstových regulátorů a kultivační podmínky pro maximální multiplikaci rostlin.
3. Závěrem své práce vypracuje pro každou odrůdu protokol množení in vitro a vyhodnotí hloubku dormance jednotlivých odrůd.

Seznam odborné literatury:

1. KLIMEŠ, J. – HAVLŮ, J. – JAŠA, B. *Růže, královna květin*. Praha: SZN, 1977.
2. MEISL, T. *Explantátová kultivace růží a možnosti komerčního využití*. Diplomová práce. ZF MENDELU, 1997.
3. periodika
4. Vlasák, M.: Posouzení Rozária v Olomouci, 2012

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: květen 2015

  
**Pavla Remerová**  
Autorka práce



  
**Dr. Ing. Helena Fišerová**  
Vedoucí práce

  
**prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.**  
Vedoucí ústavu

  
**prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.**  
Děkan AF MENDELU

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Záchrana genofondu vybraných starých odrůd růží z areálu Flora Olomouc pomocí množení *in vitro*“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

Podpis



## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat vedoucí diplomové práce Dr. Ing. Heleně Fišerové a Ing. Zuzaně Staňkové za poskytnutí cenných rad, praktických připomínek, odborné vedení a trpělivost.

Touto cestou bych poděkovala Ing. Tomášovi Vyhnánkovi, Ph.D. za poskytnuté rady a pomoc v laboratoři při analýze DNA.

Děkuji také svým rodičům a blízkým přátelům za podporu během svého celého studia.

## **ABSTRAKT**

V bakalářské práci „Záchrana genofondu vybraných starých odrůd růží z areálu Flora Olomouc pomocí množení *in vitro*“ jsou uvedeny postupy odběrů explantátů a založení primární kultury odrůd růží Klimentina, Jan Palach, Fortissimo, Pastorale a Julius Fabiancs de Misefa. Byl vypracován protokol množení růží *in vitro* a vybráno medium a kultivační podmínky pro udržovací množení v genové bance. Odrůdy Klimentina, Jan Palach, Fortissimo, Pastorale a Julius Fabiancs de Misefa vytvořily její základ. Nedílnou součástí uvedených výsledků je sledovaná tvorba kořenů a převedení zakořeněných rostlin do nesterilních podmínek. Na závěr práce byla testována stabilita donorové a explantátové rostliny SSR primery u odrůd Klimentina, Jan Palach, Fortissimo a Julius Fabiancs de Misefa.

Klíčová slova: *Rosa*, genová banka, *in vivo*, SSR primery

## **ABSTRACT**

In the thesis "Saving the gene pool of selected varieties of old roses from the area Flora Olomouc using *in vitro* propagation" are listed procedures for sampling explants and primary cultures foundation varieties of roses Klimentina, Jan Palach, Fortissimo, Pastorale and Julius Fabiancs de Misefa. It was developed a protocol *in vitro* propagation of roses and selected media and culture conditions for the maintenance of multiplication in gene bank. Varieties Klimentina, Jan Palach, Fortissimo, Pastorale and Julius Fabiancs de Misefa formed its foundation. An integral part of the above results indicate that the formation of roots and convert rooted plants in non-sterile conditions. Finally, we tested the stability of donor plants and plant tissue using SSR primers in the varieties Klimentina, Jan Palach, Fortissimo and Julius Fabiancs de Misefa.

Keywords: *Rosa*, gene bank, *in vivo*, SSR primers

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>12</b>
3.1	BOTANICKÉ ZAŘAZENÍ RŮŽÍ .....	12
3.2	EVROPSKÝ PRAKTICKÝ SYSTÉM .....	13
3.3	SOUČASNÝ SYSTÉM DLE WFRS .....	14
3.4	MORFOLOGIE RŮŽÍ .....	15
3.4.1	Květy .....	15
3.4.2	Barva a vůně květů .....	17
3.4.3	Listy .....	18
3.4.4	Ostny .....	19
3.4.5	Plody .....	19
3.4.6	Kořeny .....	21
3.4.7	Stonek .....	21
3.5	ROZMNOŽOVÁNÍ RŮŽÍ .....	22
3.5.1	Rozmnožování v „ <i>in vivo</i> “ podmínkách .....	22
3.5.1.1	Množení semeny .....	22
3.5.1.2	Očkování .....	22
3.5.1.3	Řízkování .....	24
3.5.1.4	Hřížení .....	24
3.5.1.5	Dělení keřů .....	25
3.5.2	Mikropropagace růží .....	25
3.5.2.1	Meristémové kultury .....	25
3.5.2.2	Klonové množení .....	26
3.5.2.3	Somatická embryogeneze .....	27
3.6	KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	27
3.6.1	Agar .....	27
3.6.2	Makroelementy .....	28
3.6.3	Mikroelementy .....	28
3.6.4	Sacharóza .....	28

3.6.5	Vitamíny .....	28
3.6.6	Růstové regulátory používané v živných médiích .....	28
3.6.6.1	Auxiny .....	29
3.6.6.2	Cytokininy .....	29
3.6.6.3	Gibereliny .....	29
3.6.6.4	Kyselina abscisová .....	29
3.7	GENOBANKY .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>31</b>
4.1	ODBĚR ROSTLINNÉHO MATERIÁLU .....	34
4.2	STERILIZACE .....	34
4.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	34
4.4	ZALOŽENÍ PRIMÁRNÍ KULTURY .....	37
4.5	MULTIPLIKAČNÍ FÁZE.....	37
4.6	ZAKOŘEŇOVÁNÍ.....	38
4.7	AKLIMACE .....	38
4.8	DLOUHODOBÁ KULTIVACE – ZÁKLAD GENOBANKY .....	38
4.9	GENETICKÉ ANALÝZY .....	39
4.9.1	Izolace DNA .....	39
4.9.2	Polymerázová řetězová reakce.....	40
4.9.3	Polyakrylamidová elektroforéza .....	41
4.9.4	Barvení gelu .....	42
4.9.5	Hodnocení analýzy SSR .....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>43</b>
5.1	STERILIZACE .....	43
5.2	VLIV TERMÍNŮ ODBĚRU NA RŮST ROSTLIN .....	43
5.3	VLIV MÉDIA NA MULTIPLIKAČNÍ FÁZI.....	44
5.4	ZAKOŘEŇOVACÍ FÁZE .....	46
5.5	AKLIMACE ROSTLIN .....	47
5.6	DLOUHODOBÁ KULTIVACE ROSTLIN PŘI NÍZKÝCH TEPLITÁCH - ZÁKLAD GENOVÉ BANKY .....	49
5.6.1	Vhodnost médií pro dlouhodobou kultivaci rostlin růží kultivovaných na světle při 7°C a 23°C 3.11.2014 .....	49

5.6.2	Vhodné medium pro množení rostlin růží při dlouhodobé kultivaci (genobanka) 26. 1. 2015 .....	53
5.7	PROTOKOL MNOŽENÍ <i>IN VITRO</i> PRO ODRŮDU KLIMENTINA.....	57
5.8	PROTOKOL MNOŽENÍ <i>IN VITRO</i> PRO ODRŮDU JAN PALACH .....	57
5.9	PROTOKOL MNOŽENÍ <i>IN VITRO</i> PRO ODRŮDU FORTISSIMO .....	58
5.10	PROTOKOL MNOŽENÍ <i>IN VITRO</i> PRO ODRŮDU PASTORALE .....	58
5.11	PROTOKOL MNOŽENÍ <i>IN VITRO</i> PRO ODRŮDU JULIUS FABIANICS DE MISEFA .....	59
5.12	DNA ANALÝZA .....	59
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>70</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>71</b>

# 1 ÚVOD

Růže si už od nepaměti získaly velkou oblibu člověka. Proč je tomu tak? Odpovědí na tuto otázku je mnoho. V první řadě jsou to vlastnosti květů charakteristické velkou různorodostí, barevností, tvarem, vůní a trvanlivostí, a v neposlední řadě jsou to snadné podmínky pěstování, vytrvalý růst a možnost pěstování „královny květin“ na záhonech i v květináčích.

Růže se stávala stále oblíbenější květinou, a proto v roce 1929 vznikla Společnost pěstitelů a milovníků růží. Na tuto společnost navazuje založení Rosa klubu v roce 1968, který sdružoval odbornou i laickou veřejnost.

V letech 1970 – 1972 bylo z iniciativy Rosa Klubu Českého zahrádkářského svazu vybudováno Rozárium jako součást botanické zahrady Flora Olomouc. V expozici je umístěno 10 000 keřů růží, z nichž přes 400 se řadí k domácím i zahraničním odrudám. Rozárium se rozkládá na ploše 3,5 ha a keře záhonových růží jsou vysázeny v prostředí betonových polí. Sadové růže jsou vysázeny v travnaté ploše.

Z důvodu rozsáhlé rekonstrukce rozária výstaviště Flora Olomouc je žádoucí zachovat cenné odrůdy botanických růží cestou převedení do „*in vitro*“ a vytvoření jejich genobanky. Propagace „*in vitro*“ kultur je nejvhodnější způsob zachování těchto cenných odrůd pro pozdější využití.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je vypracování nejvhodnějších postupů odběru rostlinného materiálu, jeho převodu do podmínek „*in vitro*“, optimalizace multiplikační, udržovací a zakořeňovací fáze a zpětný převod do nesterilních podmínek. Nedílnou součástí tohoto procesu je srovnání DNA matečné rostliny s regenerovanou rostlinou v podmínkách „*in vitro*“ a tím prokázat její identitu.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Botanické zařazení růží

Rod *Rosa* je velmi rozsáhlý a nejednotné je i jeho řazení do jednotlivých podrodů podle rhodologů. Základním botanickým tříděním růží je systém podle A. Rhedera.

**Rhederův systém rodu *Rosa*:**

**Rod: *Rosa***

**Podrody:**

- I. *Hulthemia*
- II. *Hesperhodos*
- III. *Platyrhodon*
- IV. *Eurosa (Rosa)*

Nejvíce druhů rodu *Rosa* je zařazeno do podrodu *Eurosa*, který byl podle morfologických znaků jednotlivých druhů rozdělen do deseti skupin nazývaných sekce.

**Sekce podrodu *Eurosa* s uvedeným příkladem zástupců:**

- I. *Pimpinellifoliae*  
(*R. pimpinellifolia*, *R. hugonis*, *R. lutea*)
- II. *Caninae*  
(*R. canina*, *R. glauca*, *R. villosa*)
- III. *Gallicanae*  
(*R. gallica*, *R. centifolia*, *R. alba*)
- IV. *Cinnamoneae*  
(*R. majalis*, *R. bella*, *R. Davidi*)
- V. *Carolinae*  
(*R. carolina*, *R. Virginiina*, *R. nitida*)



VI. *Indiceae*

(*R. gigantea*, *R. chinensis*, *R. odkryta*)

VII. *Banksianae*

(*R. banksiae*, *R. cymosa*)

VIII. *Laevigatae*

(*R. laevigata*)

IX. *Synstylae*

(*R. arvensis*, *R. filipes*, *R. helenae*)

X. *Bracteatae*

(*R. bracteata*)

(Havlů, Jaša a Klimeš, 1977)

Nejpočetnější sekci je sekce *Cinnamoneae*, která zahrnuje 85 druhů růží. Naopak nejméně početné jsou sekce *Gallicaneae* a *Laevigatae* s jedním druhem, dále sekce *Banksianae* se dvěma druhy, sekce *Bracteatae* také se dvěma druhy a sekce *Indiceae* se třemi druhy (Růže. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]).

### 3.2 Evropský praktický systém

Evropský praktický systém třídění růží slouží především laickým pěstitelům růží, přičemž jim postačuje k vhodné výsadbě růží na zahrádkách i ve veřejné zeleni.

I. Záhonové mnohokvěté a velkokvěté růže

- čajohybrydy a pernetiantky
- remontantky a bourbonky
- polyantky a polyantahybrydy
- floribundy a floribunda grandiflory

II. Pnucí růže

- hybridy *Rosa wichuraiana*
- hybridy *Rosa multiflora*
- lambertky

- pnoucí čajohybridy – climbing typy
- ostatní hybridy

### III. Sadové růže

- tzv. botanické druhy
- kulturní zahradnické hybridy *Rosa rugosa*, *Rosa gallica*, *Rosa lutea*
- ostatní hybridy

(Jaša a Zavadil, 2008)

## 3.3 Současný systém dle WFRS

Systém byl vypracován koncem 20. století sdružením WFRS ( World Federation of Rose Societies). Systém rozděluje růže do tří skupin:

### I. Staré keřové růže

- tzv. botanické růže označené zkratkou Spc.
- hybridy tzv. botanických druhů, HSp
- různé druhy s heterogenními předky
- staré zahradní růže keřovitého typu, vzniklé před čajohybridy

### II. Staré zahradní záhonové růže

- čínské (Ch)
- bourbonky (B)
- noisetky (Nois)
- čajovky

### III. Současné keřovité růže

- čajohybridy (TH)
- floribunda grandiflora (Fl Gr.)
- floribunda (Fl)
- polyantky (P), polyantahybridy (PH)
- růže miniaturní (Min)

(Jaša a Zavadil, 2008)

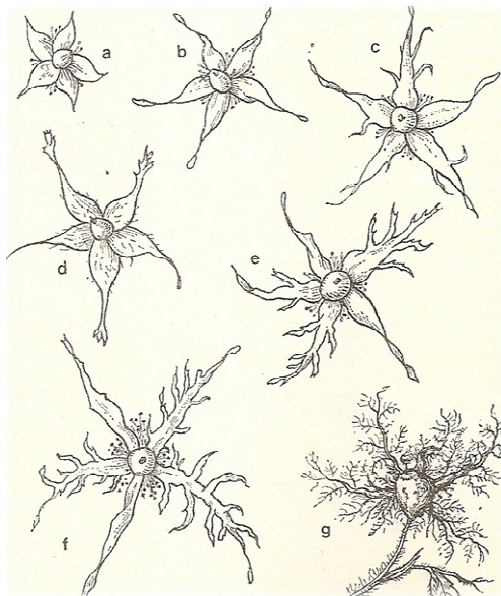
### 3.4 Morfologie růží

Morfologie růží je nezbytná pro určování růží do jednotlivých skupin. Níže jsou uvedeny důležité morfologické znaky.

#### 3.4.1 Květy

Květ je u růže nejvýznamnějším orgánem z hlediska třídění (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

U všech druhů tvoří kalich pět kališních lístků (petalů). Rozdělují se na celokrajné, krátké, protáhlé, kopinaté až podlouhlé, rozšířené nebo s rozšířenými špičkami, různě zpeřené i dlouhé, s různými přívěsky, ale i mechovité (obrázek č. 1)(Jaša a Zavadil, 2008).



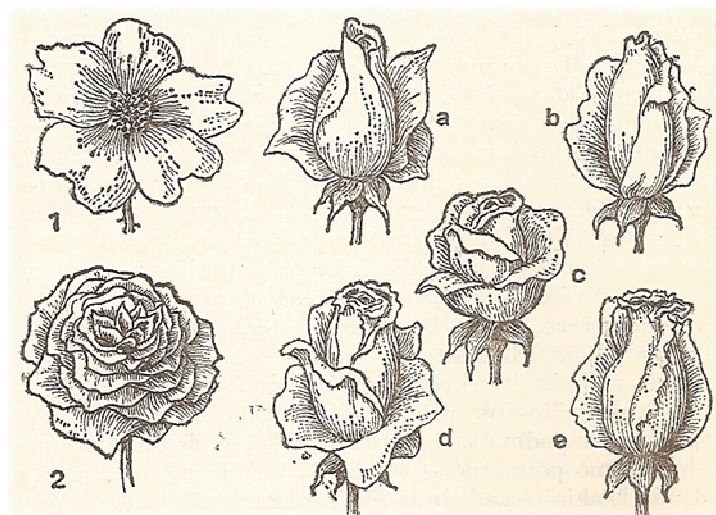
Obrázek č. 1: Tvary kališních lístků: a) celokrajné, b) celokrajné protáhlé, c) celokrajné s rozšířenými špičkami, d) málo zpeřené, e) zpeřené, f) silně zpeřené, g) mechovité. (Převzato z: Havlů, Jaša a Klimeš, 1977)

Dalším důležitým určovacím prvkem je typ květu. Rozlišujeme květy jednoduché s 5 – 8 korunními plátky. Tento typ květu mají převážně botanické druhy (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977), výjimečně i ušlechtilé odrůdy (Jaša a Zavadil, 2008). Dalším typem květu jsou květy jednoduše plné s 9 – 15 korunními plátky. Tento typ květu mají polyanthy. Dále rozlišujeme květy poloplné u floribund a čajohybridů, které mají 16 – 25

korunních plátků ve 2 – 4 kruzích. Dále květy plné s 26 – 40 korunními plátky uspořádané v 5 – 8 kruzích a květy velmi plné skládající se z více než 40 korunních plátků uspořádaných ve více než 8 kruzích. Tyto dva typy květů mají pouze čajohybridy (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

Tvar květu je závislý na velikosti korunních plátků, tvaru a pevnosti (obrázek č. 2).  
Rozlišujeme:

- květ plochý
- květ hranatý
- květ kalichový
- květ pohárkovitý
- květ kulovitý
- květ střečovitý
- květ urnovitý
- květ pivoňkovitý
- květ kaméliovitý
- květ spirálovitý



Obrázek č. 2: Tvary květů: 1. květ jednoduchý, 2. květ plný; a) protáhle štíhlý, b) špičatý, c) kulovitý, d) vejčitý, e) urnovitý (Převzato z: Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

### 3.4.2 Barva a vůně květů

Barevnost květů růží sahá přes bílou, žlutou, růžovou až po červenou (Jaša a Zavadil, 2008). Ostatní barvy, jaké známe dnes, vznikly postupným křížením (Větvička, 2002). V současné době jsou k dispozici jednobarevné, dvoubarevné, vícebarevné, smíšené a žíhané odrůdy a jediná odrůda „Josef Klimeš“ velmi tmavě červené barvy byla vyšlechtěna J. Urbanem.

Barvy květů jsou především ovlivněny buněčnou stěnou petalů. Petaly utváří více vrstev buněk, přičemž vysoký vliv na barvu květu mají vnější vrstvy na vrchní i spodní straně petalů. Nezanedbatelné jsou i vlivy vnějších podmínek, např. vlastnosti půdy, světelné podmínky a výživa.

Vůně květů růží má stejnou důležitost jako např. velikost a tvar květu. Nenasyčené aromatické alkoholy, terpeny i jejich deriváty, fenoly, éterické oleje, estery, silice, pryskyřice a další, to vše tvoří vůni květu.

Následující tabulka přehledu odrůd růží podle vůně byla vytvořena pro čajohybridy a používá se při hodnocení nových odrůd (Jaša a Zavadil, 2008).

Tabulka 1: Přehled odrůd růží podle vůně

SKUPINA	BODY	INTENZITA VŮNĚ
1	0	naprosto bez vůně „Neues Europa“ (1965)
2	1	téměř neznatelná vůně „Lovita“ (1966)
3	2	vůně znatelná „South Seas“ (1962)
4	3	velmi slabá vůně „Femina“ (1962)
5	4	slabá vůně „Michéle Meilland“ (1955)
6	5	středně silná vůně „Königin der Rosen“ (1964)
7	6	silná vůně „Bel Ange“ (1963)
8	7	velmi silná vůně „Whisky“ (1968)
9	8	málo výrazná vůně „Kardinál“ (1967)
10	9	výrazná vůně „Koré“ (1980)
11	10	silně výrazná vůně „Silver Star“ (1965)

Převzato z: (Jaša a Zavadil, 2008).

### 3.4.3 Listy

Listy růží mají různý tvar, velikost, ale i postavení (obrázek č. 3)(Jaša a Zavadil, 2008). Jsou lichozpeřené a rozlišují se počtem lístků. U evropských botanických druhů jich bývá 5 – 9 u jiných botanických druhů jich bývá 3 - 17 (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977). Pokud má růže lesklé kožovité listy, znamená to, že má vyšší rezistenci k listovým chorobám (Walter, 2005).

Nedílnou součástí listů jsou palisty přisedlé k řapíku (Růže. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]). Jsou významné při určování odrůd (Jaša a Zavadil, 2008).



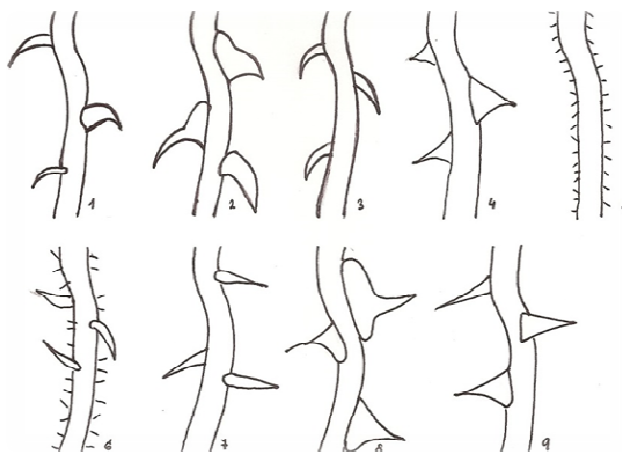
Obrázek č. 3: Tvary listů a lístků: a) lístky podlouhle špičaté (*R. moschata*), b) lístky okrouhlé (*R. rugosa*), c) lístky podlouhlé (*R. setigera*), d) lístky malé a široce vejčité (*R. hugonis*), e) lístky velké a široce vejčité (čajovka „Maréchal Niel“). Převzato z: (Havlů, Jaša, Klimeš, 1977).

### 3.4.4 Ostny

Jejich tvar a velikost jsou různé. Rozeznáváme také zahnutí ostnů, jejich barvu a hustotu na stonku (Jaša a Zavadil, 2008). Viz obrázek č. 4.

Havlů, Jaša a Klimeš (1977) uvádí: „Ostny jsou bodlinaté útvary vzniklé přetvořením chlupů pokožky, kdežto trny vznikají přetvořením samostatných orgánů.“ O třicet let později Jaša a Zavadil (2008) uvádí: „Ostny, lidově zvané trny, jsou bodlinaté útvary, které se vyvinuly z povrchových buněk pokožky výhonů, z kališních lístků či listových nervů, příp. vznikly přeměnou chloupků.“

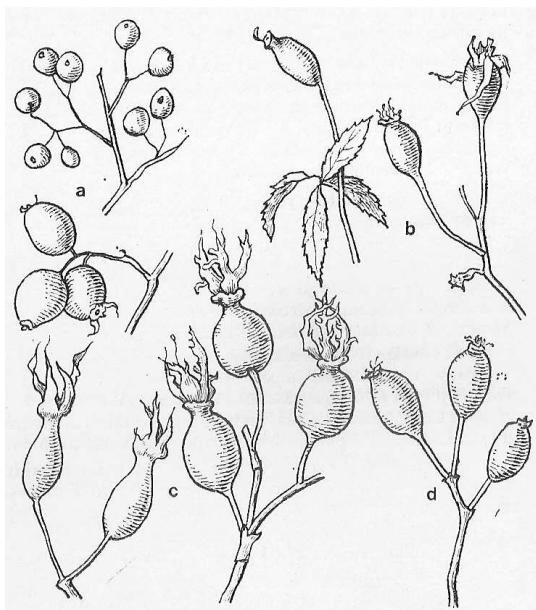
Trny jsou metamorfované orgány (Luxová, 1974).



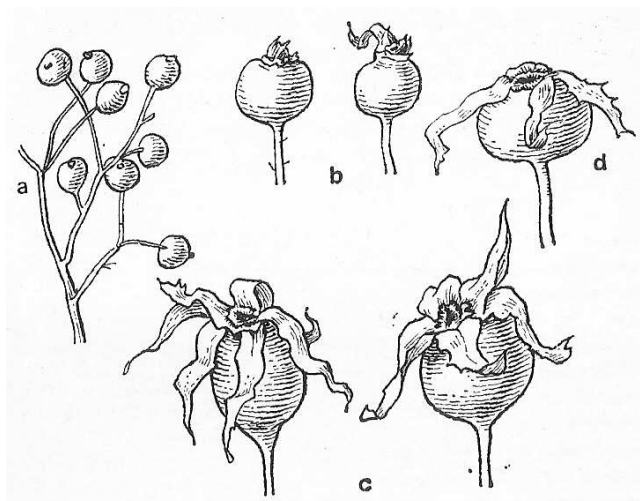
Obrázek č. 4: Tvary ostnů: 1) hákovitě zahnutý, 2) široce hákovitě zahnutý, 3) hákovitý, 4) krátký trojúhelníkovitý, 5) štětínkovitý, jemný, 6) štětínkovitý, různotvarý, 7) šídlovitý, 8) paprskovitý, 9) tříhranný dlouhý (autor: Remerová dle předlohy: Jaša a Zavadil, 2008)

### 3.4.5 Plody

Šípek, na jehož vzniku se podílejí stonek, květní lůžko, kalich a koruna, není vlastním plodem růže (Větvička, 2002). Plodem růží je složené souplodí nažek. Šípek je obvykle barvy červenooranžové až červené (Šípky. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]), výjimku tvoří některé růže se žlutými nebo červenofialovými šípkami (Větvička, 2002). Plody botanických a ušlechtilých odrůd růží jsou znázorněny na obrázku č. 5 a č. 6.



Obrázek č. 5: Tvary plodů tzv. botanických druhů růží: a) kulovité - *R. multiflora* a *R. rubiginosa*, b) hruškovité - *R. sempervirens* a *R. arvensis*, c) urnovité - *R. canina*, d) lahvicovité - *R. pendolina* (Převzato z: Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).



Obrázek č. 6: Tvary plodů ušlechtilých růží: a) polyanka „Orléans“, b) polyanthybridy „D. T. Poulsen“ a „Ave Maria“, c) floribundy „Heidelgruss“ a „Freude“, d) čajohybrid „Crimson Glory“ (Převzato z: Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

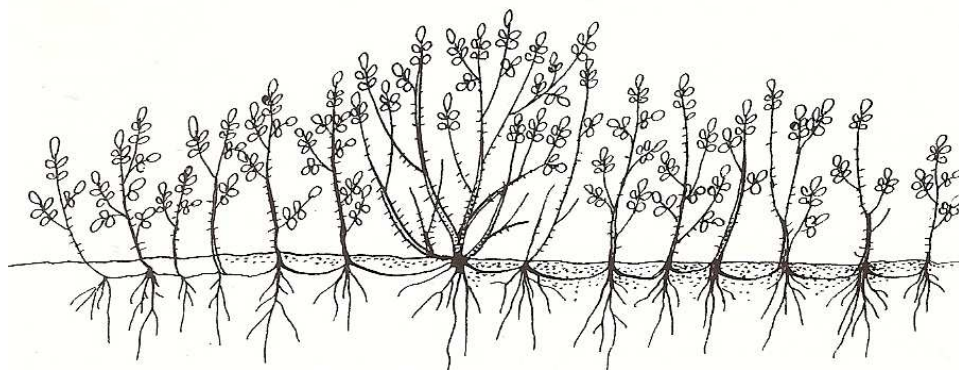


### 3.4.6 Kořeny

Botanické druhy mají kořenový systém tvořen hlavním kúlovým kořenem, který se dále větví na kořeny prvního a dalších řádů až po vláscité kořínky (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

U růží množených odkopky, oddělky nebo řízký, čili vegetativně množených růží, je hlavní kořen nahrazen kořeny prvního řádu. Kořeny prvního řádu se dále větví na kořeny dalších řádů až po vláscité kořínky (Jaša a Zavadil, 2008).

U některých druhů se tvoří polykormony, podzemní výběžky stonkového charakteru (Větvička, 2002). Viz obrázek č. 7.



Obrázek č. 7: Některé růže se podzemními výběžky rozrůstají do velkých polykormonů. (Převzato z: Větvička, 2002).

### 3.4.7 Stonek

Růže mají stonek dřevnatý a větvený. U některých liánovitých růží může stonek ročně přirůstat až o 4 metry, zatímco stonky keřových růží přirůstají o 30 - 100 centimetrů (Větvička, 2002).

## 3.5 Rozmnožování růží

### 3.5.1 Rozmnožování v „*in vivo*“ podmínkách

#### 3.5.1.1 Množení semen

Generativní rozmnožování pomocí semen se v dnešní době využívá jen u botanických druhů, tedy druhů určených pro podnože (Větvička, 2002). Semena se nejčastěji získávají z botanických růží *R. canina*, *R. multiflora* nebo *R. laxa* v období srpen - září (Jaša a Zavadil, 2008).

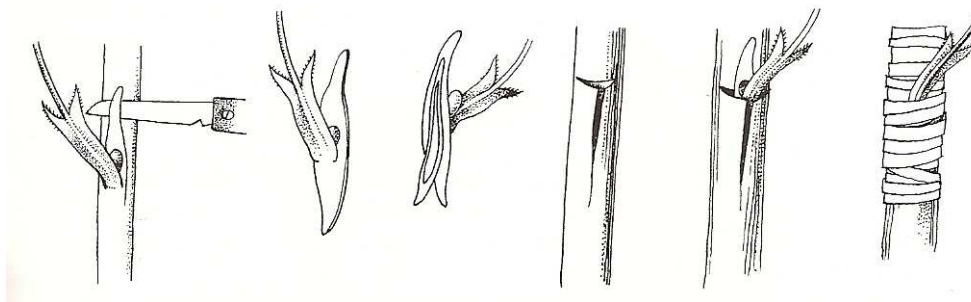
#### 3.5.1.2 Očkování

Nejvíce využívanou metodou množení růží je očkování ušlechtilých růží na podnož, tedy vegetativní rozmnožování (Očkování rostlin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]). Vermeulen (2003) uvádí, že očkování je: „Metoda štěpování, při které se odřízne ještě nerozvinutý pupen (tzv. očko) v paždí listu a přenesse se (naočkuje se) na podnož.“

Místo, kde byla rostlina naočkována, poznáme jako ztlustlé místo mezi nadzemní částí ušlechtilé odrůdy a kořeny podnože (Markley, 2009).

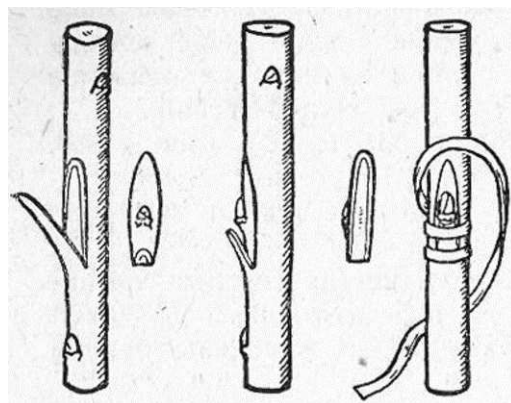
Je známo více možností, jak očkovat růže, např. na bdící očko, na spící očko a Forkertův způsob. Nejčastěji se používá očkování na spící očko (Richter a Proll, 2008).

Metoda očkování na spící očko se provádí od poloviny července do poloviny srpna. Důležité je, že se očkování provádí při dostatku mízy. Rouby si připravíme dopředu. Je nutné, aby měly dobře vyvinutá očka. Samotné očkování provádíme tak, že na krčku podnože vytvoříme tzv. řez T. Očko se štítkem vyříznuté z rouby vsuneme do řezu T, seřízneme přesahující štítek a ovážeme gumičkou nebo PVC páskou (Jaša a Zavadil, 2008). Viz obrázek č. 8.



Obrázek č. 8: Postup při očkování ušlechtilých odrůd na podnož. (Převzato z: Větička, 2002).

Forkertova metoda se používá především při očkování růží na vysokém kmínku. Její výhoda je, že růže můžeme očkovat při dostatku i nedostatku mízy, tedy téměř po celý rok (vyjma zimního období)(Havlů, Jaša a Klimeš, 1977). Pokud si vybereme tento způsob očkování, musíme nejdříve naříznot na podnoži rovný proužek kůry, do kterého vsuneme seříznuté očko z rouby. Štítek s očkem musí být stejně široký jako zářez na podnoži (Vilkus, 2003). Forkertova metoda je znázorněna na obrázku č. 9.



Obrázek č. 9: Očkování metodou Forkertovou

(Převzato z: <http://www.halonoviny.cz/images/showimage/24379654/3/2>).

Cílem očkování je dosáhnout nové rostliny, u které podnoží bude botanická odrůda nesoucí ušlechtilou odrůdu (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).

### 3.5.1.3 Řízkování

Metoda řízkování je nejjednodušší metodou množení růží zejména pro zahrádkáře. Existují ale i růže, které řízkováním množit nelze. Hlavním důvodem je nedostatečné zakořenění řízku a špatný vzrůst rostliny (Richter a Proll, 2008).

Množení kořenovými řízků lze dobře aplikovat u botanických druhů. Pro toto množení použijeme robustnější kořeny, které rozkrájíme na řízky o velikosti 6 – 8 cm (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977). Po zasazení na záhon započnou kořenové řízky rašit.

Dalším způsobem řízkování je množení pomocí polovyzrálých řízků. Polovyzrálé řízky se odebírají ze střední části výhonů. Řízky by měly mít alespoň tři očka. Z takovýchto řízků se odstraní listy, ponechá se pouze nejvýše postavený list na řízku. Takto připravené řízky se vpichují do zkyplené půdy až po nejvrchnější očko a zakryjí se nejlépe zavařovací sklenicí (Jaša a Zavadil, 2008).

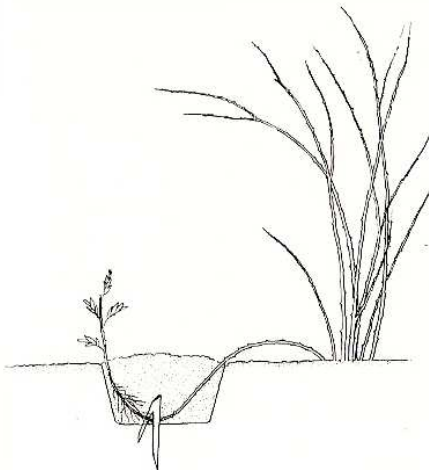
Dále můžeme růže množit pomocí dřevitých řízků. Pomocí této metody množíme převážně růže určené pro podnože a polyantky (Havlů, Jaša a Klimeš 1977). Abychom mohli tuto metodu použít, musíme dřevité řízky odebírat z rostlin v pozdním podzimu před začátkem silných mrazů. Pokud je mírný podzim, můžeme připravené řízky napíchat do kypré půdy a celé přihnout zeminou. Na jaře z pupenů vyraší výhony (Walter, 2005).

Množení bylinnými řízků se používá k množení miniaturních, velkokvětých a mnohokvětých růží a také pro podnože (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977). Tuto metodu používáme i pro rychlení růží. Řízky odebíráme z vrchních částí zdravé rostliny, přičemž se tak jako u dřevitých řízků odstraní listy vyjma nejvýše postaveného. Připravené řízky sázíme do rašeliny s pískem nebo s perlitem a zakryjeme fólií. Za optimální teploty a vlhkosti začnou řízky kořenit. Po zakořenění a vyrašení pupenů můžeme přesazovat do květináčů (Jaša a Zavadil, 2008).

### 3.5.1.4 Hřížení

Hřížení je velmi jednoduchá metoda rozmnožování. Na rozdíl od očkování a řízkování, které vyžadují zručnost, hřížením si může růže množit i naprostý laik (*Množení dřevin hřížením* [online]).

1 – 2 roky staré výhony staré výhony ohneme k zemi do předem vykopané jamky v blízkosti keře a připevníme háčkem (Havlů, Jaša a Klimeš 1977). Viz obrázek č. 10. Vrchní část výhonu ponecháme nad zemí a zastříháme (Walter, 2005). V průběhu vegetační doby výhony zakoření. Po vyjmutí zakořeněných rostlin sázíme samostatně (Havlů, Jaša a Klimeš, 1977).



Obrázek č. 10: Rozmnožování sadové růže hřížením. (Převzato z: Walter, 2005).

#### 3.5.1.5 Dělení keřů

U botanických druhů, které odnožují, můžeme tento způsob množení použít. Rostliny vytvářejí tzv. pravokořenné odnože. Výhodou takto připravených odnoží je, že netvoří plané výhony (Walter, 2005).

### 3.5.2 Mikropropagace růží

#### 3.5.2.1 Meristémové kultury

Meristém je oblast buněk, které jsou schopny se dělit a diferencovat rostlinné orgány (Meristem, *Encyclopædia Britannica, Inc.* [online]). K základním vlastnostem meristematických kultur patří geneticky stabilní a fenotypově homogenní potomstvo (Novák, 1990).

Pro množení v „*in vitro*“ podmínkách se používají apikální a axilární pupeny (Rout a kol., 1999). Apikální pupeny nebo nodální segmenty s axilárními pupeny se

regenerují bez kalusové fáze (Pati a kol., 2005). Apikální meristémy nesou v rostlině genetickou informaci druhu (Novák, 1990).

### 3.5.2.2 Klonové množení

Způsob vzniku genotypově a fenotypově stejného potomstva bez použití generativního rozmnožování se označuje jako klonové množení. Takový způsob množení je nejvhodnější pro druhy nebo odrůdy, které nevytváří semena. Můžeme ho také použít u odrůd, které tvoří semena, pokud chceme zachovat jejich genotypovou a fenotypovou stálost (Novák, 1990).

V roce 1974 Murashige popsal tři základní fáze úspěšné mikropropagace. O sedm let později, v roce 1981, doplnili tyto tři základní fáze o fázi 0 Debergh a Maene kvůli problémům s kontaminací. V současné době tedy existuje pět etap (Trigiano, Gray, 2011):

#### I. Fáze 0: selekce donorových rostlin a jejich příprava

Před založením kultury je velká pozornost věnována výběru rostlin pro explantáty. Vybrané rostliny jsou udržovány v čistých, kontrolovaných podmínkách, které umožňují aktivní růst a snižují pravděpodobnost nemocí.

#### II. Fáze I: založení aseptických kultur

Cílem této etapy je aseptické založení terminálních nebo laterálních meristémových explantátů bez patogena. Primární kultury získané z původních rostlin mohou být sterilizované prýty vrcholových meristémů nebo terminální či laterální pupeny.

Přítomnost mikrobiálních kontaminantů může nepříznivě ovlivnit přežití prýtů, růst a míru multiplikace. Délka sterilizace, pozice explantátu na stonku, jeho velikost a polyfenolová oxidace jsou faktory, které mohou mít vliv na fázi I.

#### III. Fáze II: množení axilárních prýtů

Fáze II je charakterizována zvýšenou tvorbou axilárních výhonků z laterálních pupenů kultivovaných na médiu s relativně vyšší hladinou cytokininů. Kultury jsou rozděleny do menších uskupení, které slouží jako řízky pro další množení. Kromě toho mohou být sklizeny jako jednotlivé nezakořeněné mikrořízky pro „*ex vitro*“ zakořeňování a aklimatizaci. Tato fáze se jeví jako nejvíce finančně nákladná.

#### IV. Fáze III: zakořenění

Tento proces může zahrnovat prodloužení výhonů před zakořeněním, zakořenění jednotlivých výhonků nebo jejich shluků a ustálení kultury ke zvýšení přežití.

#### V. Fáze IV: převod do přirozeného prostředí

Konečný úspěch závisí na schopnosti převádět a obnovit intenzivně rostoucí rostliny z „*in vitro*“ do „*ex vitro*“ prostředí. To zahrnuje aklimaci rostliny do podmínek s nižší relativní vlhkostí a vyšší intenzitou světla. Aklimace „*in vitro*“ kultur je obtížná z důvodu heterotrofního způsobu výživy a špatné kontroly ztráty vody.

(Trigiano a Gray, 2011)

#### 3.5.2.3 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je způsob, jak regenerovat nové rostliny z rostlinných tkáňových kultur. Je to proces, kdy je rostlina nebo embryo odvozeno z jedné nebo více somatických buněk (Somatic embryogenesis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]).

V první řadě se z diferencovaného pletiva odvodí embryogenní kalus. Pro indukci kalusu se do médií přidávají auxiny, obvykle 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina. Další vývoj embryí je na médiu bez přítomnosti auxinů, ale potřebují redukovaný dusík a vyšší dávku aminokyselin (Hradilík, 2005).

### 3.6 Kultivační média

Vybrat správné kultivační médium je po sterilitě druhým nejtěžším úkolem mikropropagace. Živná půda musí dodávat rostlině vše potřebné k jejímu růstu, výživě a vývoji (Hradilík, 2005). Media obsahují velké množství níže uvedených komponent.

#### 3.6.1 Agar

Agar je výtažek z mořských řas (Hradilík, 2005). Chemicky je to polymer složený z podjednotek galaktózy (All About Agar. *Science Buddies* [online]). Způsobuje tuhnutí media. Tuhost můžeme regulovat přidáním množstvím agaru, popřípadě pH média

(Trigiano, Gray, 2011). Obvykle je do média přidáváno 5 – 8 g.l<sup>-1</sup> (Meisl, 1997). pH média se pohybuje od 5,6 do 6,0.

### **3.6.2 Makroelementy**

Hlavními makroelementy přidávanými do živného média jsou dusík, draslík, hořčík, vápník, fosfor a síra. Hořčík a síru dodáváme v podobě MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, fosfor jako NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> nebo NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, vápník jako CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O nebo Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, draslík jako KCl, KNO<sub>3</sub> nebo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Trigiano, Gray, 2011).

### **3.6.3 Mikroelementy**

Mezi mikroelementy řadíme železo (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O nebo výjimečně (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>), bor (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), kobalt (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), mangan (MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O nebo MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O), molybden (NaMoO<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O), měď (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) a zinek (ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) v malých koncentracích (Trigiano, Gray, 2011).

### **3.6.4 Sacharóza**

Sacharóza je hlavním zdrojem energie a uhlíku. Je významná pro heterotrofní výživu rostlinných explantátů. Do médií je přidávána v koncentraci 20 – 30 g.l<sup>-1</sup> (Hradilík, 2005).

### **3.6.5 Vitamíny**

Vitamíny jsou organické látky, které jsou součástí enzymů nebo kofaktorů pro základní metabolické funkce (Trigiano, Gray, 2011). Obvyklé vitamíny, které se aplikují, jsou thiamin (0,1 – 10,0 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina nikotinová (0,1 – 5,0 mg.l<sup>-1</sup>), pyridoxin (0,1 – 10,0 mg.l<sup>-1</sup>) a myo-inositol (50 – 5000 mg.l<sup>-1</sup>) (Hradilík, 2005).

### **3.6.6 Růstové regulátory používané v živných médiích**

V kultivačních médiích jsou používány auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová.



### 3.6.6.1 Auxiny

Auxiny jsou do kultivačních médií přidávány hlavně pro indukci tvorby adventivních kořenů, stimulaci růstu apikálních meristémů, stimulaci růstu kalusu a buněk a k indukci somatické embryogeneze (Hradilík, 2005).

Z přirozených auxinů jsou do médií přidávány indoly-3-octová kyselina (IAA) a indoly-3-máselná kyselina (IBA). Ze syntetických auxinů jsou do médií nejčastěji přidávány kyselina naftyloctová (NAA), 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D) a 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová kyselina (picloram). IBA, NAA, 2,4-D a picloram se používají v koncentraci od 0,001 do 10,0 mg/l. (Trigiano, Gray, 2011).

### 3.6.6.2 Cytokininy

Mezi nejpoužívanější cytokininy patří zeatin, benzylaminopurin (BAP), isopentenyladenin (2-iP) a kinetin.

Ve vysokých koncentracích (1 – 10  $\mu$ M) indukují tvorbu adventivních prýtlů, ale inhibují tvorbu kořenů (Trigiano, Gray, 2011). Ve společnosti auxinů výrazně stimulují dělení buněk (Procházka, Šebánek, 1997).

### 3.6.6.3 Gibereliny

Gibereliny se do kultivačních médií přidávají jen ojediněle. Pro projevení účinku giberelinu je nutná přítomnost auxinu (Hradilík, 2005).

Nejčastěji se používá giberelin GA<sub>3</sub> a giberelin GA<sub>7</sub> (Hradilík, 2005). Pomáhají stimulovat prodlužování internodií a u některých druhů jsou důležité pro růst meristému (Trigiano, Gray, 2011).

### 3.6.6.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) má významný vliv na somatickou embryogenezi. Do kultivačních médií je přidávána méně často

### **3.7 Genobanky**

Genové banky zajišťují ochranu a uchování formou „*ex situ*“, to znamená, že chrání a uchovávají genetický materiál mimo původní místa výskytu (Smykal, 2008). Mohou uchovávat semenné kolekce, kolekce živých rostlin a kolekce explantátů připravených v laboratoři (Ochrana genofondu rostlin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

Materiál pro množení v „*in vitro*“ podmínkách byl odebírán z areálu Rozária Flory Olomouc. Podle zprávy hodnotící odrůdovou skladbu růží v Rozáriu (Vlasák, 2012) bylo odebráno celkem 27 odrůd ohrožených růží, přičemž pro vypracování metodiky množení bylo vybráno pět odrůd.

Mezi vybrané odrůdy patří růže vyšlechtěné v Německu, České republice, Dánsku, na Ukrajině a Slovensku.

K pokusům byly vybrány tyto odrůdy:

### Odrůda Klimentina

Odrůda patří do skupiny čajohybridů. Byla vyšlechtěna v roce 1955 na Ukrajině. Vyšlechtila ji ukrajinská šlechtitelka Klimenková. Rostlina je vysoká 90 – 120 cm. Barva květu je jasně růžová. Květy jsou velké 11 – 13 cm. Růže je vhodná pro řez květů (Žlebčík, 2011).



Obrázek č. 11: Habitus odrůdy Klimentina

Obrázek č. 12: Květ odrůdy Klimentina

### **Odrůda Jan Palach**

Odrůda patří do skupiny sadových růží. Byla vyšlechtěna v roce 2001 českým šlechtitelem Josefem Urbanem. Rostlina je vysoká okolo 120 cm. Průměrná velikost květu je 9 cm. Kvete červeně (Žlebčík, 2011).



Obrázek č. 13: Habitus odrůdy Jan Palach



Obrázek č. 14: Květ odrůdy Jan Palach

### **Odrůda Fortissimo**

Odrůda patří do skupiny sadových růží. Byla vyšlechtěna v roce 1974 v Německu šlechtitelem GPG. Rostlina dosahuje výšky až 240 cm. Květy dorůstají velikosti kolem 11 cm. Kvete světle červeně až oranžově. Růže je vhodná pro samostatnou výsadbu (Žlebčík, 2011).



Obrázek č. 15: Habitus odrůdy Fortissimo



Obrázek č. 16: Květ odrůdy Fortissimo



### **Odrůda Pastorale**

Odrůda patří do skupiny sadových růží. Vyšlechtil ji Poulsen v roce 1970 v Dánsku. Nalezneme ji také pod názvem POUrale. Odrůda je vysoká 150 až 200cm. Květy jsou velké 8 – 10 cm, vonící. Její květy prolínají barvy červené, oranžové a růžové (Žlebčík, 2011).



Obrázek č. 17: Habitus odrůdy Pastorale



Obrázek č. 18: Květ odrůdy Pastorale

### **Odrůda Julius Fabianics de Misefa**

Odrůda patří do skupiny historických sadových růží. Vyšlechtil ji R. Geschwind v roce 1902 na území dnešního Slovenska. Dorůstá výšky až 130 cm. Květy jsou fialově červené, intenzivně vonící, velké asi 8 cm. Vznikla zkřížením Bardou Job (B) × Souvenir du Dr. Passot (T) (Žlebčík, 2011).



Obrázek č. 19: Habitus odrůdy Julius  
Fabianics de Misefa



Obrázek č. 20: Květ odrůdy Julius  
Fabianics de Misefa

## 4.1 Odběr rostlinného materiálu

Odběr růží byl prováděn ve dvou etapách – v zimním a jarním období.

## 4.2 Sterilizace

Sterilizace rostlinného materiálu je nezbytná pro udržení sterility rostlinných explantátů po celou dobu kultivace.

Před zahájením sterilizace byly výhony omyty mýdlem pod tekoucí vlažnou vodou, nastříhány na nodální segmenty a roztříděny podle velikosti do kádinek. Takto připravené segmenty byly připraveny ke sterilizaci.

Sterilizace byla prováděna chemicky pomocí 0,2% chloridu rtuťnatého ( $\text{HgCl}_2$ ). Pro sterilizaci byly použity různě silné výhony. S ohledem na tuto skutečnost byla doba působení chemikálie od 3 do 13 minut dle vyzrálosti výhonu a velikosti očka – pupenu. Po uplynutí doby působení chloridu rtuťnatého byly segmenty 3 x promývány ve sterilizované destilované vodě po dobu deseti minut.

Celý proces sterilizace probíhal ve flow-boxu, tedy ve sterilním prostředí. Flow-box byl před začátkem práce s explantáty vytřen buničitou vatou namočenou v 96% ethanolu.

Nástroje (pinzeta, sklápel, nůžky) a ostatní pomůcky (např. Petriho misky) byly sterilizovány v horkém vzduchu po dobu 1 hodiny při  $170^\circ\text{C}$ .

Skleničky s živnými médii byly sterilizovány v autoklávu při teplotě  $121^\circ\text{C}$  21 minut a tlaku 1,1 KPa.

## 4.3 Kultivační média

Pro kultivaci explantátů bylo vybráno základní médium MS (Murashige a Skoog, 1962) s  $2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BA a  $0,1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  NAA na základě výsledků diplomové práce Meisla (1997).

Tabulka 2: Složení základního média Murashige a Skoog (1962)

<b>Roztok A: makroelementy, zásobní roztok do 1000 ml – dávka na 10 l media (dávkování 100 ml na 1 l média):</b>	<b>Sumární vzorec</b>	<b>Objem (g)</b>
Dusičnan amonný	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5

Dusičnan draselný	$\text{KNO}_3$	19,0
Heptahydrát síranu hořečnatého	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
Fosforečnan draselný	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7
<b>Roztok B: mikroelementy, zásobní roztok do 100 ml – dávka na 100 l média</b> (dávkování: 1 ml na 1 l média):		<b>Objem (mg)</b>
Kyselina boritá	$\text{H}_3\text{BO}_3$	620
Tetrahydrát síranu manganatého	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860
Jodid draselný	$\text{KI}$	83
Dihydrát molybdenanu sodného	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
Pentahydrát síranu měďnatého	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
Hexahydrát chloridu kobaltnatého	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
<b>Roztok C: zásobní roztok do 100 ml – dávka na 10 l média</b> (dávkování 10 ml na 1 l média):		<b>Objem (g)</b>
Dihydrát chloridu vápenatého	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
<b>Roztok D</b> (dávkování 0,8 ml na 1 l média):		
4% roztok Fe-chelátu		
<b>Organické sloučeniny:</b> (dávkování na 1 l média)		
Sacharóza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$30 \text{ g.l}^{-1}$
Edamin		$1 \text{ g.l}^{-1}$
Glycin	$\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_2$	$2 \text{ mg.l}^{-1}$
Agar		$7 \text{ mg.l}^{-1}$
I-inozitol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$100 \text{ mg.l}^{-1}$
Nikotinová kyselina	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Pyridoxin HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{ClNO}_3 \cdot \text{HCl}$	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Thiamin HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	$0,1 \text{ mg.l}^{-1}$

Při přípravě média byl nejprve rozvařen agar v destilované vodě, pak byly postupně přidávány organické, anorganické složky média a rozpuštěná sacharóza. Růstové regulátory byly přidávány jako poslední, přičemž byly nejprve rozpuštěny – BA v 1 M hydroxidu draselném (KOH) a NAA v 96% ethanolu. Hodnota pH média byla měřena pH metrem. Při nízkém pH média bylo pH upravováno pomocí 1 M KOH, při vysokém pH média bylo upravováno 1 M kyselinou fosforečnou ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

Po dosažení pH v rozmezí 5,8 – 5,9 bylo médium dávkováno do skleněných kultivačních nádob o objemu 200 ml po 20 – 25 ml, uzavíráno kovovým uzávěrem s kouskem molitanu a sterilizováno v autoklávu.

V důsledku žloutnutí a usychání rostlin některých odrůd, byly testovány další dvě kultivační média a to WPM (Lloyd, McCown, 1980) s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA a MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA (laboratorní značení MSM).

Tabulka 3: Složení média Wood plant medium (WPM)

<b>Makroelementy:</b>	<b>Vzorec</b>	<b>Objem (mg.l<sup>-1</sup>)</b>
Dusičnan amonný	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,00
Dusičnan vápenatý	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	386,80
Síran hořečnatý	MgSO <sub>4</sub>	180,54
Fosforečnan draselný	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
Chlorid vápenatý	CaCl <sub>2</sub>	72,50
Síran draselný	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990,00
<b>Mikroelementy:</b>		
Kyselina boritá	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
Monohydrát síranu manganatého	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	22,30
Heptahydrát síranu zinečnatého	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,60
Dihydrát molybdenanu sodného	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25
Pentahydrát síranu měďnatého	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,25
	FeNaEDTA	36,70
<b>Vitamíny:</b>		
Myo-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100,00
Thiamin HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS . HCl	1,00
Kyselina nikotinová	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0,50
Glycin	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2,00
Pyridoxin HCl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> ClNO <sub>3</sub> . HCl	0,50
<b>Ostatní složky:</b>		
Sacharóza	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	25,00 g.l <sup>-1</sup>
Agar		7,00 g.l <sup>-1</sup>



Médium MSM je tvořeno stejnými makroelementy, makroelementy a organickými sloučeninami jako médium MS. Liší se pouze přidanými růstovými regulátory. V médiu MSM bylo použito  $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$  BA a  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA.

Pro zakořeňování jednotlivých odrůd bylo vybráno tzv. médium H. Toto médium je tvořeno  $\frac{1}{2}$  koncentrací MS bez růstových regulátorů s přidavkem aktivního uhlí. Hodnoty pH média H se pohybují od 5,5 do 5,8.

#### **4.4 Založení primární kultury**

Primární kultura byla zakládána ve dvou etapách:

1. zimní odběr od prosince do února
2. jarní a letní odběr od března do července

Po procesu sterilizace (popsáno výše) byla zakládána primární kultura. Primární kultura byla založena na jednotné médium MS s 2 BA a 0,1 NAA a umístěna pod zářivkový rošt s 16 h světla a 8 h tmy,  $23^{\circ}\text{C}$ . První pupeny vyrašily během týdne od založení kultury. Po zvětšení výhonů vyrostlých z pupenů cca 3 – 4 týdny byly jednotlivé prýty po segmentaci (rozpasážíování) dávány na stejné médium.

#### **4.5 Multiplikační fáze**

Jako multiplikační médium bylo použité stejné médium jako u primárních kultur. Multiplikační fáze začala asi po 3 – 4 týdnech po přepasážíování výhonků z primárních kultur při zachování stejných kultivačních podmínek. Nově vyrostlé výhonky byly pasážíovány opět na stejné médium po dalších 3 – 4 týdnech s cílem získání co největšího počtu rostlin dané odrůdy.

Některé odrůdy začaly na médiu MS s  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  BA a  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA hynout a měly nažloutlé listy. V důsledku těchto poznatků byly do multiplikační fáze zapojeny další dvě kultivační média a to WPM s  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$  BA a MSM. Jejich střídání v procesu multiplikace výrazně snížilo žloutnutí a odumírání rostlin.

## 4.6 Zakořeňování

Vzrostlé prýty (1 – 2,5 cm vysoké) byly po ročním pasážování převedeny na zakořeňovací médium H. Také bylo vyzkoušeno médium MS se sníženým obsahem sacharózy na 2%. Explantáty byly kultivovány v kultivační místnosti 3 – 4 týdny.

## 4.7 Aklimace

Zakořeněné rostliny byly po 4 týdnech vyjmuty ze sterilního prostředí kultivačních nádob, byly z nich mechanicky odstraněny zbytky kultivačního média a omyty pod vlažnou tekoucí vodou. Takto připravené rostlinky byly zasazeny do plastových skleníků do směsi zahradnického substrátu a perlitu. V plastovém skleníku se udržovala vysoká vzdušná vlhkost kolem 80%. Teplota, při které byly rostliny ve skleníku pěstovány, se pohybovala okolo 22°C.

Po šesti týdnech byly rostliny růží přesázeny do plastových květináčů. Teplota pěstování byla zachována a osvětlení 16 h světla a 8 h tmy také. Rostliny byly pravidelně roseny či zalévány vodou.

## 4.8 Dlouhodobá kultivace – základ genobanky

Pro dlouhodobou kultivaci byla vybrána následující média (Dubová, Smíšková, přednášky):

1. MS 2% sacharóza
2. MS 3% manóza a 5% sacharóza
3. H 2% sacharóza
4. H 3% manóza a 5% sacharóza

Jednotlivá média byla rozlévána do zkumavek po 5 ml pro kultivaci při 6 – 8 °C. Pro kontrolní kultivaci při pokojové teplotě byla rozlévána do kultivačních baněk. Po vysterilizování byly na tato čtyři média přepasážovány odrůdy Fortissimo a Jan Palach.

Takto připravené kultury pro dlouhodobou kultivaci byly dány do chladu (zkumavky) a rostliny v kultivačních nádobách byly ponechány při 23°C v kultivační místnosti pro srovnání rychlosti růstu.

Vliv složení jednotlivých médií na odrůdy se hodnotil po dvou měsících kultivace. Po vyhodnocení bylo vybráno pro další kultivaci médium MS 2% sacharóza, které se jevílo jako vhodnější. Na vybrané médium byly převedeny všechny odrůdy růží. Pokus se hodnotil také po dvou měsících.

## 4.9 Genetické analýzy

Genetické analýzy jsou do práce přikládány z důvodu ověření shodnosti DNA explantátových růží a růží z přirozených podmínek – matečnic, z nichž byl při III. odběru materiálu na množení *in vitro* (24. 6. 2014) odebrán i listový materiál jednotlivých odrůd a zamražen při -18°C pro pozdější srovnávací analýzy.

### 4.9.1 Izolace DNA

Izolace DNA se prováděla z listů donorových a z lístků kultivovaných odrůd Klimentina, Jan Palach, Fortissimo a Julius Fabianics de Misefa. Pro nedostatek rostlinných explantátů nemohla být DNA analýza provedena u odrůdy Pastorale. Při postupu izolace byl použit kit DNeasy® Plant Mini Kit.

Izolace měla následující průběh:

1. Na analytických vahách bylo odváženo 100 mg listů, pomocí nůžek byly nastříhány a poté převedeny do 1,5 ml mikrozkuvek.
2. Mikrozkuvky byly ponořeny do tekutého dusíku na 30 vteřin, kde se zamrazily.
3. Ponořené mikrozkuvky s rostlinným materiálem byly pomocí drtičky homogenizovány.
4. K homogenátu bylo přidáno 400  $\mu$ l pufru AP1 a 2  $\mu$ l Rnázy a následně byly zkuvky pomocí vortexu promíchány.
5. Směs homogenátu, Rnázy a pufru AP1 byla inkubována ve vodní lázni při teplotě 65 °C 10 minut, vzorky byly 2krát až 3krát během inkubace promíchány.
6. Po inkubaci při 65°C bylo do mikrozkuvek přidáno 130  $\mu$ l pufru AP2, který způsobuje deproteinizaci. Po zvortexování se zkuvky inkubovaly 5 minut při 0°C.

7. Veškerý obsah mikrozkušavek byl přemístěn do speciálních fialových mikrozkušavek s kolonou, ty byly centrifugovány na chlazené odstředivce při 18 000 otáčkách za minutu 2 minuty. Během centrifugace se vytvoří kapalná fáze a pelet (pevná fáze).
8. 400 µl kapalně frakce bylo přeneseno pomocí mikropipety do nové 1,5 ml zkumavky, dále bylo přidáno 600 µl pufru AP3/E a promícháno pipetou.
9. 650 µl směsi bylo přeneseno na novou bílou kolonu mikrozkušavky, centrifugováno 1 minutu při 6000 otáčkách za minutu, po skončení odstředování byl tekutý podíl pod kolonou odstraněn a na kolonu bylo napipetováno zbylých 350 µl směsi bylo centrifugováno za stejných otáček a po stejnou dobu, tekutý podíl byl odstraněn a kolona přenesena do nové 2 ml zkumavky.
10. Do kolony bylo přidáno 400 µl pufru AW a kolony se centrifugovaly 1 minutu při 6000 otáčkách za minutu, po odstředění byl tekutý podíl pod kolonou odstraněn a na kolonu bylo nanášeno znovu 400 µl pufru AW a centrifugace probíhala další 2 minuty při 18000 otáčkách za minutu.
11. Kolona byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky a na kolonu bylo nepipetováno 100 µl předehřátého pufru AE, po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě, se zkumavka s kolonou centrifugovala 1 minutu při 6000 otáčkách za minutu. Na kolonu se napipetovalo 50 µl AE pufru a postup se zopakoval.
12. Bílá kolona byla z mikrozkušavky odstraněna a získaný vzorek DNA byl použit pro další analýzy.

Po dokončení izolace byly jednotlivé vzorky proměřeny UV – spektrofotometrem PICODROP, aby byla zjištěna koncentrace a čistota DNA ve vzorcích.

#### **4.9.2 Polymerázová řetězová reakce**

Principem polymerázové řetězové reakce (PCR) spočívá v replikaci nukleových kyselin. Zakládá se na opakující syntéze úseků DNA ve směru 5'→3'. Do reakce vstupuje termostabilní DNA-polymeráza, nukleotidy, forward primer, reverse primer a pufr.

PCR reakce probíhá ve třech 25 – 35krát se opakujících fázích:

1. při 94°C probíhá denaturace řetězců DNA

2. při 30 – 60°C se připojí primery na jednotlivá vlákna
3. při 65 – 70°C začne DNA-polymeráza syntetizovat nové řetězce

(Šmarda a kol., 2005)

Při přípravě reakční směsi byl namíchán mastermix podle tabulky č. 3. Ten byl rozpipetován do 0,2 ml zkumavek určených pro PCR po 24  $\mu$ l a do každé z nich přidán 1  $\mu$ l sledovaného vzorku DNA. Takto připravené zkumavky byly uzavřeny a vloženy do komory Thermocycleru. Na přístroji byl nastaven program odpovídající profilu reakce. Profil reakce, podmínky a SSR primery byly vybrány dle Hibrand-Saint Oyanta a kol. (2008).

Tabulka 4: Složení PCR reakce:

Složky reakce	Počet vzorků: 1 (uvedeno v $\mu$ l)
Deionizovaná H <sub>2</sub> O	16,8
Pufř	5
dNTP (nukleotidy)	0,1
F primer (forward)	1
R primer (reverse)	1
<i>Taq</i> polymeráza	0,1

#### 4.9.3 Polyakrylamidová elektroforéza

Pro polyakrylamidovou elektroforézu je nutné nejdříve připravit polyakrylamidový gel. Složení gelu je uvedeno v tabulce č. 4. Po ztuhnutí gelu byly do jednotlivých jamek nepipetovány PCR produkty a do dvou jamek velikostní markery.

Gel umístěný ve skleněných deskách byl umístěn do přístroje pro elektroforézu. Jako vodič elektrického proudu byl použit pufř namíchaný z 900 ml destilované H<sub>2</sub>O a 100 ml 10krát koncentrovaného TBE. Elektroforéza probíhala 10 minut při 100 V, a po uplynutí 10 minut bylo napětí zvýšeno na 300 V po dobu 90 – 105 minut.

Tabulka 5: Složky polyakrylamidového gelu

Složka gelu	Dávkování
Destilovaná H <sub>2</sub> O	34,65 ml
10krát koncentrované TBE	5,00 ml
Akryl/bis	10,00 ml
TEMED	334,00 µl
10% APS	334,00 µl

#### 4.9.4 Barvení gelu

Pro zviditelnění produktů byly použity čtyři roztoky. Prvním roztokem byl fixační roztok (41,6 ml ethanolu, 2 ml kyseliny dusičné a 356,4 ml destilované H<sub>2</sub>O), druhým roztokem byl 0,2% dusičnan stříbrný (2 g dusičnanu stříbrného a 1000 ml H<sub>2</sub>O), třetím roztokem byla destilovaná H<sub>2</sub>O a čtvrtým byla tzv. vývojka (10 ml 37% formaldehydu, 22,2 g NaOH a 730 ml destilované H<sub>2</sub>O). Po dokončení celého cyklu byl gel vložen do fólie, zataven a uložen do lednice.

#### 4.9.5 Hodnocení analýzy SSR

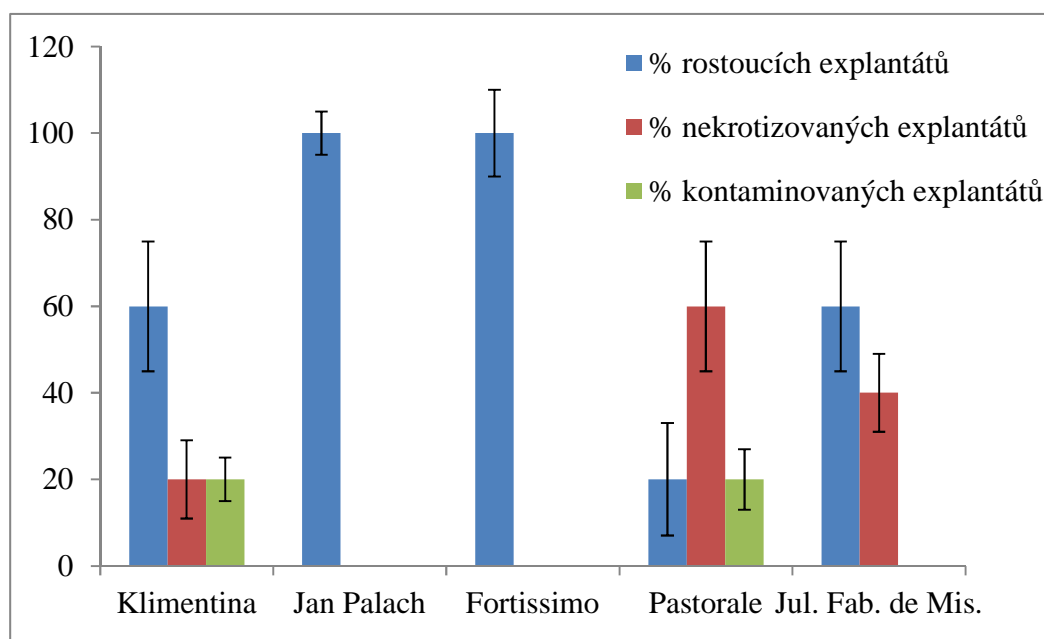
Po vytvoření binomické matice byly hodnoty zpracovány pomocí programu FreeTree verze 9.1 (Hampl a kol., 2001), metody UPGMA a Nei – Liho koeficientu podobnosti.

K jednotlivým mikrosatelitům byl vypočten index diverzity (DI) (Weir, 1990), pravděpodobnost identity (PI) (Paetkaul a kol., 1995) a polymorfický informační obsah (PIC) (Weber, 1990). Program TreeWiew verze 6.1 (Page, 1996) výsledky převedl do podoby dendrogramu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Sterilizace

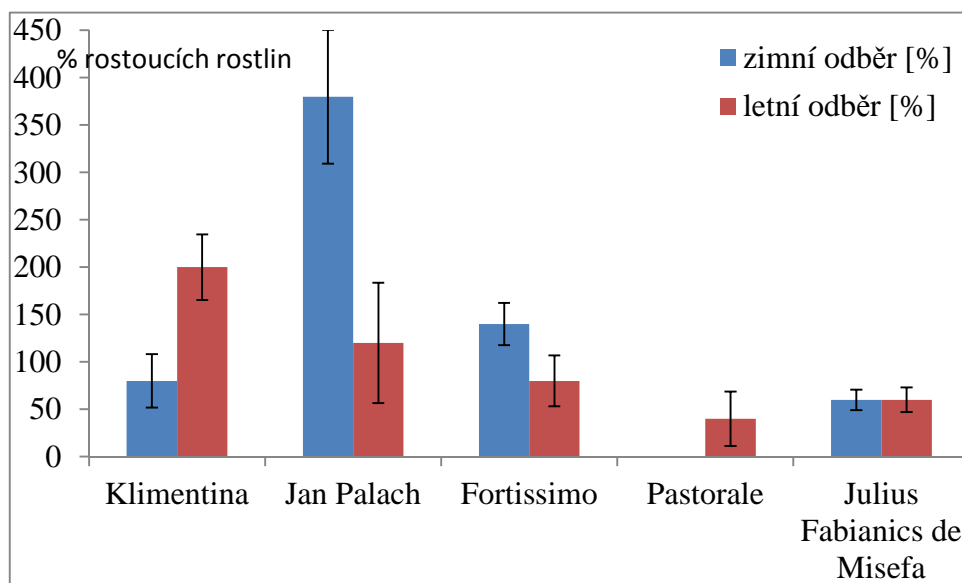
Nejlepší výsledek sterilizace (graf č. 1) byl pozorován u odrůd Jan Palach a Fortissimo, kde při různých dobách (3 – 13 min) sterilizace bylo procento rostoucích rostlin 100%. Významné rozdíly v době sterilizace a velikosti sterilovaných nodálních segmentů nebyly shledány.



Graf č. 1: Výsledky sterilizace

### 5.2 Vliv termínů odběru na růst rostlin

Odběr byl prováděn ve dvou etapách, a to v zimě a od jara do léta. Při každém odběru bylo vždy založeno minimálně 5 baněk od odrůdy. V grafu č. 2 je uveden % nárůst počtu baněk s rostoucími rostlinami jednotlivých odrůd ze zimních a letních odběrů po 10 měsíční kultivaci s přepasážováním.



Graf č. 2: Procentické hodnocení multiplikace ze zimních a letních termínů odběrů

Z grafu je patrné, že odrůdy Klimentina a Pastorale rostly statisticky průkazně lépe z letních odběrů, zatímco odrůdy Jan Palach a Fortissimo měly prokazatelně lepší koeficient množení ze zimních odběrů. Odrůda Julius Fabianics de Misefa rostla shodně jak z letních, tak ze zimních odběrů.

### 5.3 Vliv média na multiplikační fázi

Jako multiplikační média byla zvolena následující:

- MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA
- WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA
- MSM

U jednotlivých odrůd byly reakce na jednotlivá média různá v určitém ročním období. Při nástupu jarního období byla pozorována lepší multiplikace a rychlejší růst všech odrůd na médiích MSM a WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. S nástupem podzimního až zimního období bylo zpozorováno žloutnutí spodních listů na těchto médiích. V tomto období byla lepší reakce rostlin na médium MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA.

Při srovnání svých výsledků s výsledky jiných autorů, bylo zjištěno, že všichni, kdo se zabývali kultivací růží, používali pouze médium MS s různou koncentrací růstových regulátorů.



Carelli a Echeverrigaray (2002) zkoumali vliv růstových regulátorů v médiu na růst růží. Zjistili, že při absenci cytokininů všechny výhonky odumřely během dvou týdnů a že přítomnost BA výrazně snižuje prodlužování prýtů. Počet výhonů se zvyšoval se zvyšující se koncentrací BA v médiích. Při použití 3,0 mg.l<sup>-1</sup> BA získali mnoho prýtů bez výrazného snížení výšky rostlin. 1,0 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,5 mg.l<sup>-1</sup> NAA mělo pozitivní vliv na rozmnožování kultivaru „Baronesse“. Na základě těchto výsledků se rozhodli pro médium s obsahem 3,0 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,5 mg.l<sup>-1</sup> NAA.

Jabbarzede a Khosh-Khui (2005) na základě své studie vybrali jako nejvhodnější médium pro mikropropagaci *Rosa damascena* MS s koncentrací 2,5 – 3 mg.l<sup>-1</sup> BA v kombinaci s nízkým obsahem IBA.

Nikbakht a kol. (2005) prováděli pokusy s *Rosa damascena* kultivary „Azaran“ a „Ghamsar“. Jejich výzkum ukázal na vhodnost použití média MS s 2,1 mg.l<sup>-1</sup> BA, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA pro kultivar „Azaran“ a stejné médium, ale bez přídavku NAA pro kultivar „Ghamsar“.

Senapati a Rout (2008) prováděli pokusy s různým obsahem BA, IAA, NAA. Dospěli k závěru, že zahrnutí 0,1 až 0,25 mg.l<sup>-1</sup> IAA s přídavkem BA do média MS zvyšuje rychlost multiplikace. Nejvyšší rychlosti multiplikace dosáhli na médiu MS s 1,5 – 2,0 mg.l<sup>-1</sup> BA, 50 mg.l<sup>-1</sup> Ads (adenin sulfát) a 0,25 mg.l<sup>-1</sup> IAA.

Razavizadeh a Ehsanpour (2008) zkoumali multiplikační média u odrůdy *Rosa hybrida* L. kultivar Blaf Red. Uvádí, že nejnižší multiplikace bylo dosaženo na médiu MS 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, 30g.l<sup>-1</sup> sacharóza, zatímco nejvyšších výhonků dosáhli na médiu MS 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA, 5 mg.l<sup>-1</sup> BA, 40 g.l<sup>-1</sup> sacharóza.

Baig a kol. (2011) množili odrůdy *Rosa gruss s Teplitz* a *Rosa centifolia* za účelem najít nejvhodnější médium pro vysoký počet výhonků a zakořeňování. Jako nejefektivnější médium zaznamenali MS s přídavkem 1,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Pro zakořeňování vybrali jako nejefektivnější ½ MS s 0,50 mg.l<sup>-1</sup> IBA.

Noodezh a kol. (2012) se zabývali mikropropagací a zakořeňováním *Rosa damascena* Mill. pomocí nodálních segmentů. Zjistili, že nejefektivnějším médiem pro zakořeňování této růže je MS s poloviční koncentrací makroprvků doplněných o 0,1 mg.l<sup>-1</sup> indoly-3-máselné kyseliny. Pro zvýšení délky výhonků použili MS s vyšším množstvím dusičnanů, vápníku a železa a přídavkem 4,0 mg.l<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurinu a 0,25 mg.l<sup>-1</sup> indoly-3-octové kyseliny.

Maurya a kol. (2013) zaznamenali nejvyšší procento regenerace výhonků na MS médiu s obsahem  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP a  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA

## 5.4 Zakořeňovací fáze

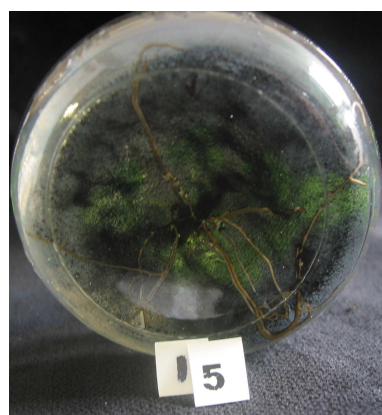
Pro zakořeňování bylo použito médium H s aktivním uhlím bez růstových regulátorů a médium MS s 2% sacharózy.

Po třech týdnech kultivace na médiu H zakořenily všechny rostliny. Délka kořenů se pohybovala od 1 do 3 cm.

Na médiu MS se počet zakořeněných rostlin blížil 100%. Délka kořenů byla 2 – 4 cm oproti médiu H.



Obrázek č. 21: Odrůda Jan Palach – médium H – 4 týdny kultivace



Obrázek č. 22: Odrůda Jan Palach – médium H – 4 týdny kultivace

Pro zakořeňovací fázi byla použita média MS a H bez růstových regulátorů což je v nesouladu s výsledky mnoha autorů. Při zkoumání této fáze bylo zjištěno, že rostliny nepotřebují k zakořeňování růstové regulátory.

Baig a kol. (2011) množili odrůdy *Rosa gruss s Teplitz* a *Rosa centifolia* za účelem najít nejvhodnější médium pro zakořeňování. Pro zakořeňování vybrali jako nejefektivnější médium  $\frac{1}{2}$  MS s  $0,50 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA.

Noodezh a kol. (2012) se zabývali mikropropagací a zakořeňováním *Rosa damascena* Mill. pomocí nodálních segmentů. Zjistili, že nejefektivnějším médiem pro zakořeňování této růže je MS s poloviční koncentrací makroprvků doplněných o  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  indoly-3-máselné kyseliny.

## 5.5 Aklimace rostlin

Po 3 – 4 týdnech kultivace na médiu H nebo MS s 2% sacharózy byly zakořeněné explantáty přesazovány do plastového skleníku.

První výsadba byla uskutečněna 27. 11. 2014 a to u odrůdy Jan Palach. Ujímatelnost této odrůdy byla 100%. Po šesti týdnech byly všechny rostliny přesázeny do květináčů. Velikost přesazovaných rostlin se pohybovala od 5 do 10 cm.



Obrázek č. 23: Odrůda Jan Palach  
po vylahvování



Obrázek č. 24: Odrůda Jan Palach  
po šesti týdnech

Jako druhá byla vylahvována odrůda Klimentina (1. 12. 2014). Odrůda se ujala z 90%. Po aklimaci ve skleníku, kdy byly zakořeněné rostliny velké od 4 do 8 cm, byla přesazena do květináčů.



Obrázek č. 25: Odrůda Klimentina  
po vylahvování



Obrázek č. 26: Odrůda Klimentina  
po šesti týdnech



Odrůdy Fortissimo a Julius Fabianics de Misefa byly přemístěny z kultivačních nádob do skleníku 7. 1. 2015. Ujímatelnost těchto odrůd se blížila 100%. Do květináčů byly odrůdy přesázeny po dosažení velikosti 5 – 8 cm. Pro pomalý růst byly do květináčů přesázeny po jedenácti týdnech.



Obrázek č. 27: Odrůda Fortissimo  
po vylahvování



Obrázek č. 28: Odrůda Fortissimo  
po jedenácti týdnech



Obrázek č. 29: Odrůda Julius Fabianics  
de Misefa po vylahvování



Obrázek č. 30: Odrůda Julius Fabianics  
de Misefa po jedenácti týdnech

U odrůdy Pasotrale nebyla aklimace provedena kvůli nedostatečnému množství explantátů – viz graf č. 2.

## **5.6 Dlouhodobá kultivace rostlin při nízkých teplotách - základ genové banky**

Cílem genové banky je co nejdéle udržení sterilního rostlinného materiálu bez vnějších zásahů – přepasážování na nová media – v co nejmenším kultivačním prostoru – vhodných kultivačních nádobkách. Genová banka byla postupně založena u všech odrůd. U odrůd Jan Palach a Fortissimo bylo provedeno srovnání vhodnosti médií. U ostatních odrůd byl založen pokus již na vybraném médiu.

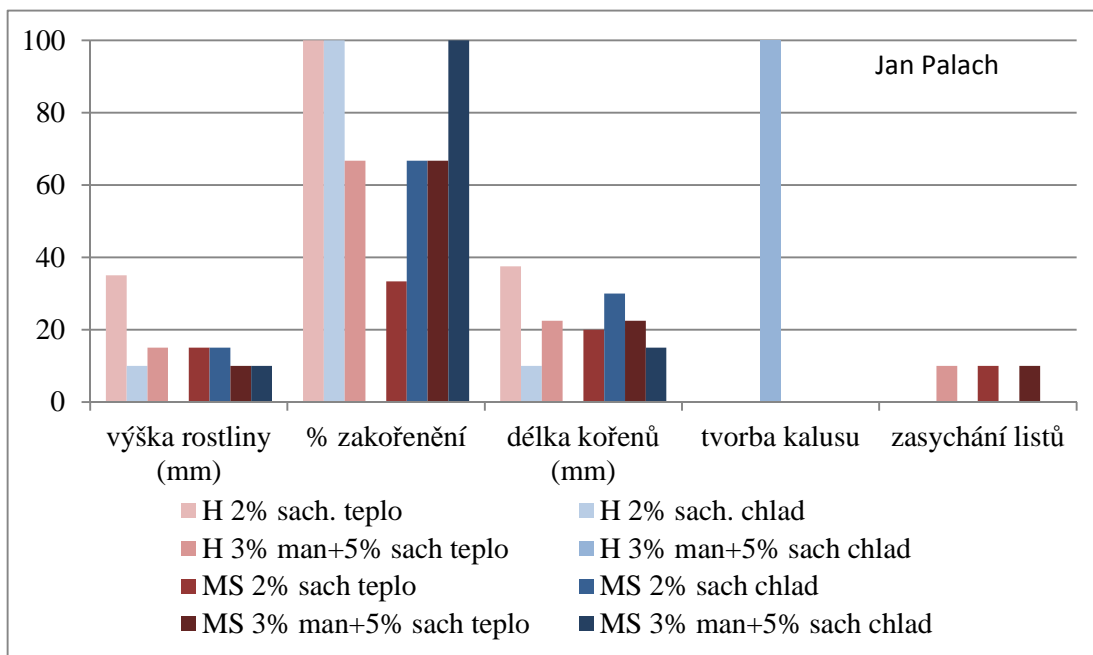
### **5.6.1 Vhodnost médií pro dlouhodobou kultivaci rostlin růží kultivovaných na světle při 7°C a 23°C 3.11.2014**

Pro první pokus byly vybrány odrůdy Jan Palach a Fortissimo pro dostatečný počet explantátů. Hodnotil se jejich vzrůst, zakořenění a délka kořenů, tvorba kalusu a zasychání listů (graf 3 a 4).

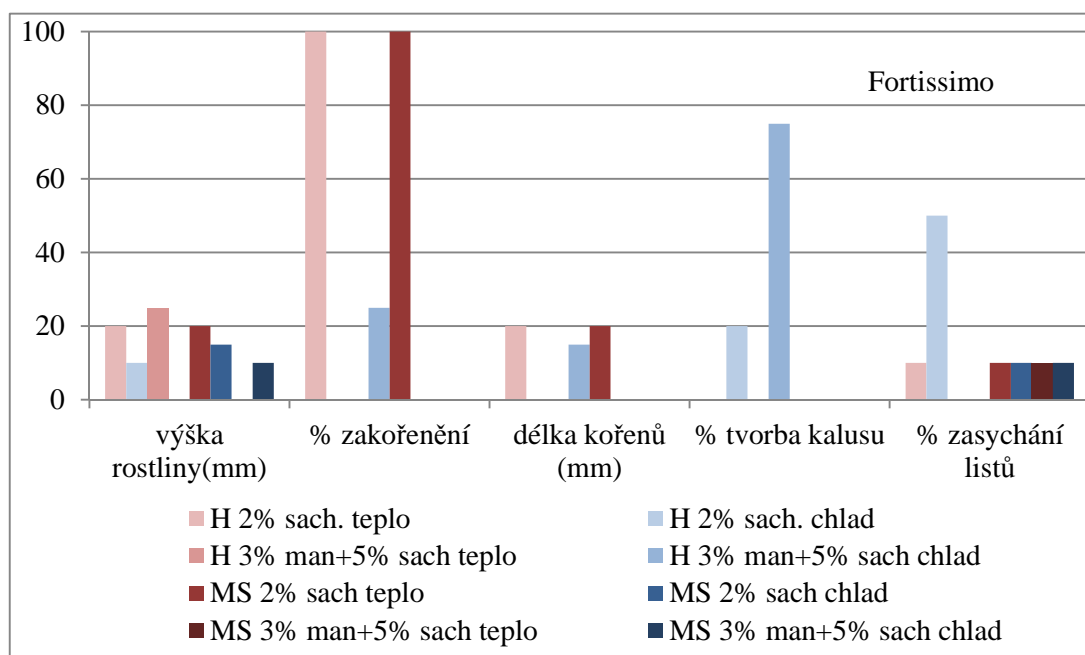
Byly vybrány čtyři typy médií:

- H 2% sacharóza
- H 3% manóza a 5% sacharóza
- MS 2% sacharóza
- MS 3% manóza a 5% sacharóza

Média byla vybrána na základě přednášek Dubové a Smíškové.



Graf č. 3: Sledované znaky na jednotlivých médiích pro odrůdu Jan Palach



Graf č. 4: Sledované znaky na jednotlivých médiích pro odrůdu Fortissimo

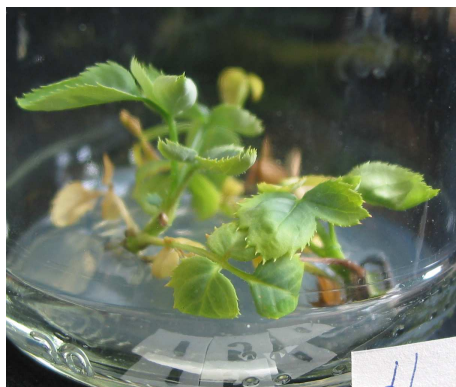
Z výsledků vyplývá, že nejlepší médium pro dlouhodobou kultivaci při nízkých teplotách (genová banka) bylo MS 2% sacharóza. U tohoto média u odrůdy Jan Palach nedocházelo k tvorbě kalusu, rostliny pěkně zakořeňovaly a moc nerostly a k zasychání

listů nedocházelo. Zasychání listů u odrůdy Fortissimo bylo z hlediska hodnocení ostatních médií nejnižší, i když rostliny hůře zakořeňovaly.

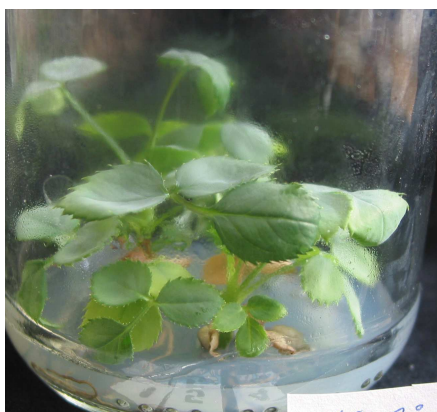
Fotografie růží po dvou měsících kultivace:



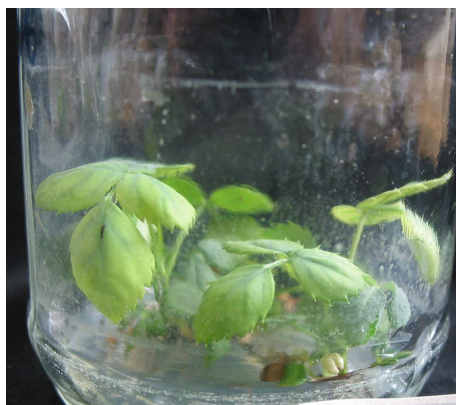
Obrázek č. 31: Odrůda Jan Palach  
H 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 32: Odrůda Jan Palach  
H 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo



Obrázek č. 33: Odrůda Jan Palach  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 34: Odrůda Jan Palach  
MS 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo

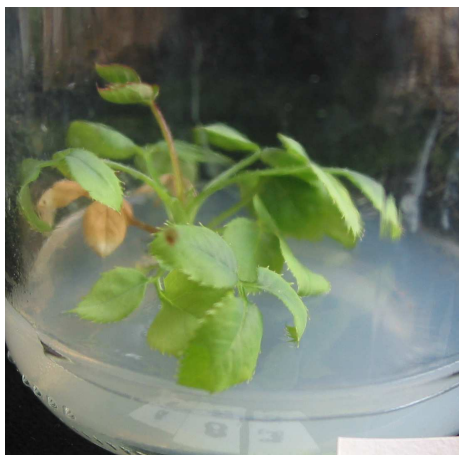


Obrázek č. 35: Odrůda Fortissimo  
H 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 36: Odrůda Fortissimo  
H 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo

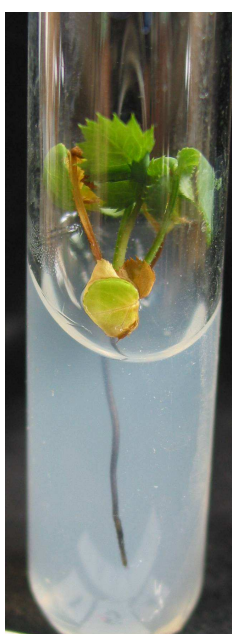




Obrázek č. 37: Odrůda Fortissimo  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 38: Odrůda Fortissimo  
MS 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo



Obrázek č. 39 \*



Obrázek č. 40 \*



Obrázek č. 41 \*



Obrázek č. 42 \*

\*

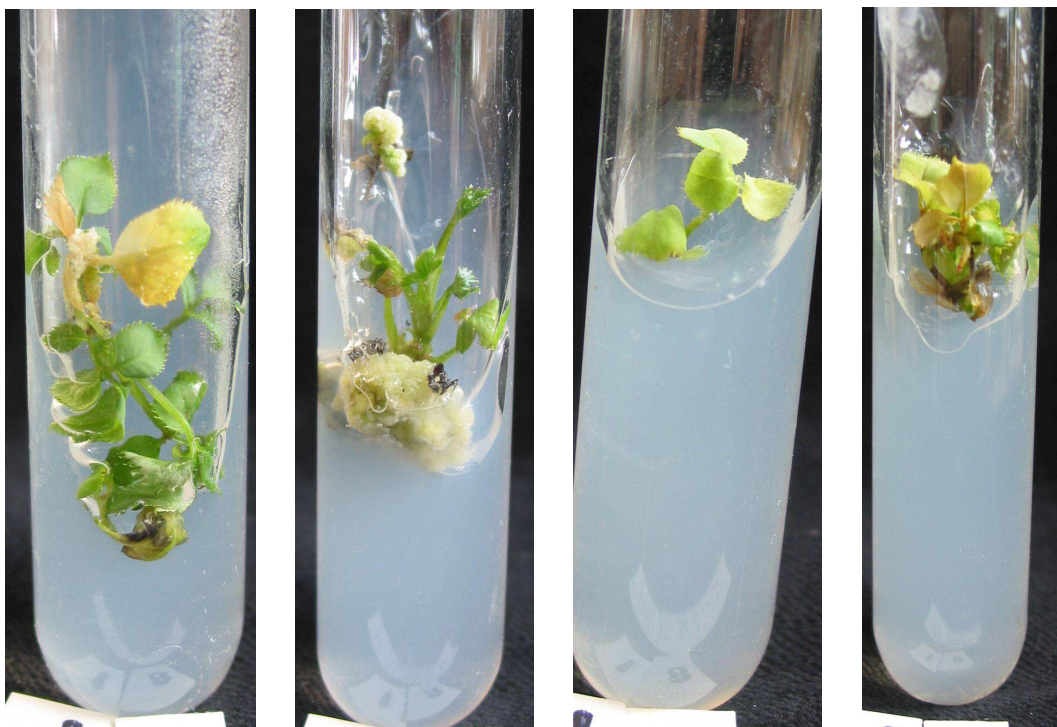
Obrázek č. 39: Odrůda Jan Palach H 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 40: Odrůda Jan Palach H 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo

Obrázek č. 41 : Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 42: Odrůda Jan Palach MS 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo





Obrázek č. 43 \*

Obrázek č. 44 \*

Obrázek č. 45 \*

Obrázek č. 46 \*

\*

Obrázek č. 43: Odrůda Fortissimo H 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 44: Odrůda Fortissimo H 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo

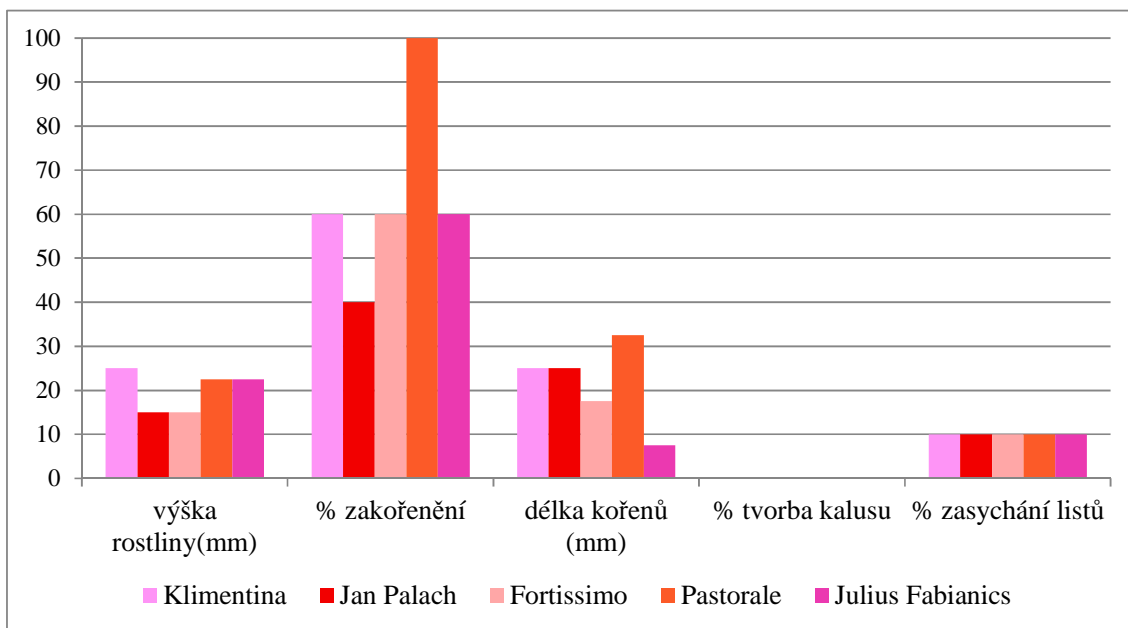
Obrázek č. 45 : Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 46: Odrůda Fortissimo MS 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo

### 5.6.2 Vhodné medium pro množení rostlin růží při dlouhodobé kultivaci (genobanka) 26. 1. 2015

Druhý pokus byl prováděn pouze na médiu MS s 2% sacharózy, protože toto médium bylo vybráno jako nejlepší pro kultivaci v genové bance.

V grafech č. 5 a 6 jsou zhodnoceny sledované znaky u jednotlivých odrůd. Hodnocení bylo děláno po dvou měsících kultivace.



Graf č. 5: Sledované znaky pro jednotlivé odrůdy na médiu MS s 2% saharózy při 23°C



Obrázek č. 47: Odrůda Klimentina  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 48: Odrůda Jan Palach  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



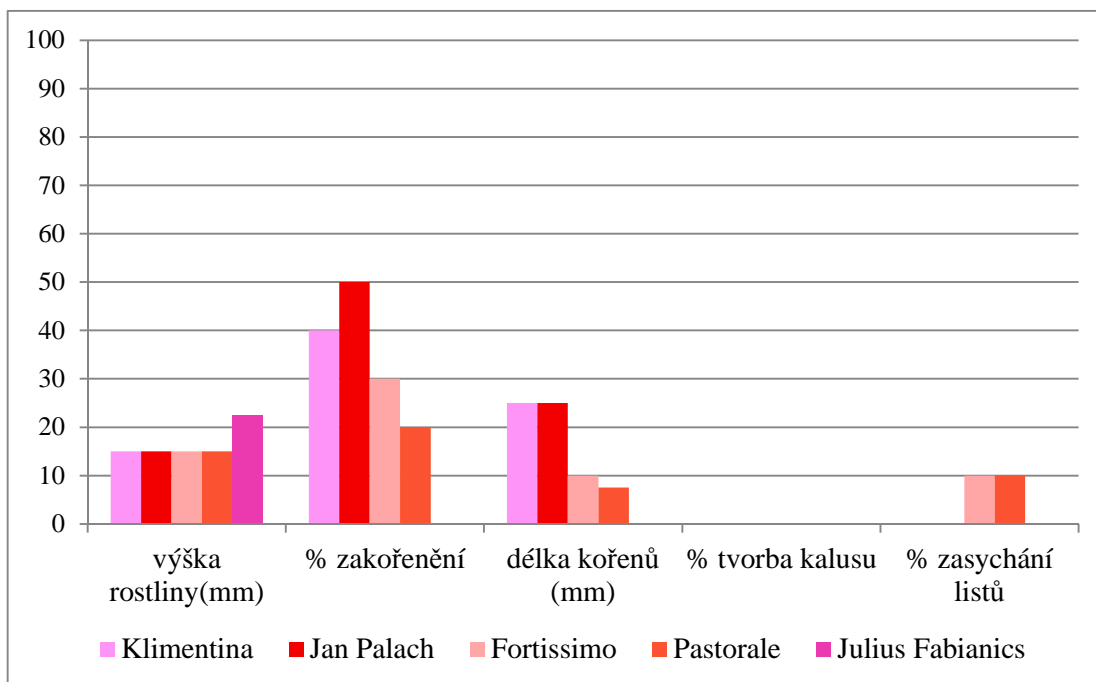
Obrázek č. 49: Odrůda Fortissimo  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



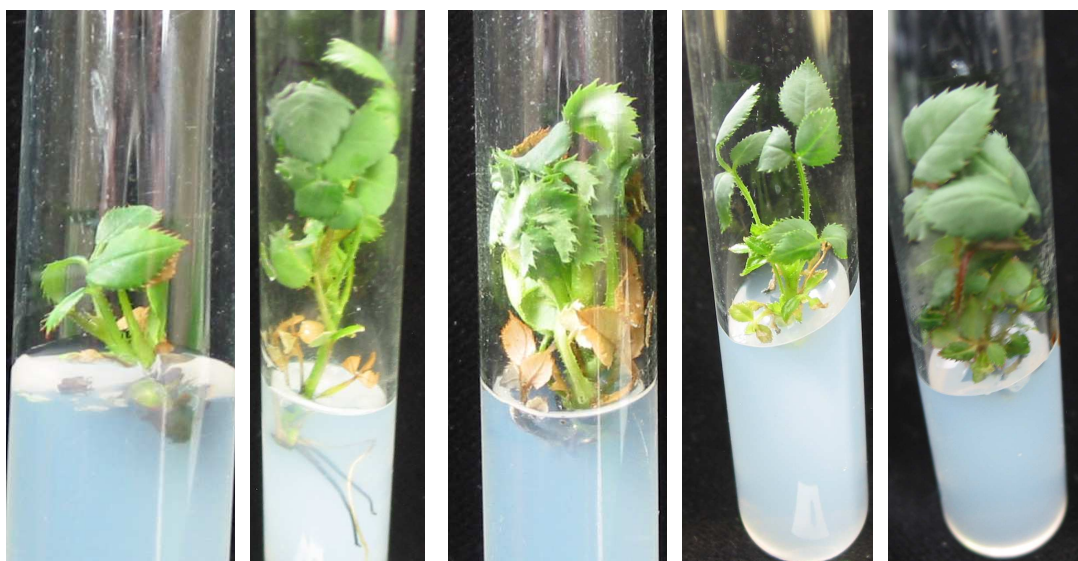
Obrázek č. 50: Odrůda Pastorale  
MS 2% sacharóza – teplo, světlo



Obrázek č. 51: Odrůda Julius Fabianics de Misefa, MS 2% sacharóza – teplo, světlo



Graf č. 6: Sledované znaky pro jednotlivé odrůdy na médiu MS s 2% saharózy při 6°C



Obrázek č. 52\*    Obrázek č.53\*    Obrázek č. 54\*    Obrázek č. 55\*    Obrázek č. 56\*

\*

Obrázek č. 52: Odrůda Klimentina MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 53: Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 54: Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 55: Odrůda Pastorale MS 2% sacharóza – chlad, světlo

Obrázek č. 56: Odrůda Julius Fabianics de Misefa MS 2% sacharóza – chlad, světlo

## 5.7 Protokol množení *in vitro* pro odrůdu Klimentina

Sterilizace odrůdy byla nejvhodnější po dobu 3 – 13 minut 0,2% HgCl<sub>2</sub> dle velikosti pupenů a nodálních segmentů.

Odrůda měla prokazatelně lepší podmínky růstu při letním odběru, kde se procento růstu odebraných nodálních segmentů blížilo 100%. Procentický nárůst činil po desetiměsíční kultivaci 100%. Bylo tedy dosaženo dvojnásobného počtu baněk.

Pro multiplikační pasážování byla použita média MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA.a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. Média byla střídána dle růstu rostlin a zasychání spodních lístků.

Pro zakořeňování bylo použito médium s ½ koncentrací MS bez růstových regulátorů s přídavkem aktivního uhlí. Segmenty tvořily kořínky po třech týdnech kultivace a jejich délka se pohybovala od 1 do 5 cm.

Při převodu do nesterilních podmínek byla odrůda nejprve šest týdnů ve skleníku a poté přesázena do květináčů. Převod nevyžadoval delší dobu růstu ve skleníku pro rychlý růst odrůdy a dobré tvoření kořenového systému. Po osmi týdnech dosáhly rostliny 30ti cm vzrůstu.

## 5.8 Protokol množení *in vitro* pro odrůdu Jan Palach

Sterilizace nodálních segmentů se jevila jako nejvhodnější po dobu 5 – 13 minut 0,2% HgCl<sub>2</sub>, protože byly odebrány silnější výhony s velkými pupeny.

Při zkoumání podmínek odběru bylo dospěno k závěru, že odrůda lépe reagovala na zimní odběr. Po desetiměsíční kultivaci činil nárůst kultivovaných baněk 300%.

Pro multiplikační pasážování byla použita média MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA.a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. Média byla střídána dle růstu rostlin, multiplikace a zasychání spodních lístků.

Pro zakořeňování bylo použito médium s ½ koncentrací MS bez růstových regulátorů s přídavkem aktivního uhlí. Segmenty tvořily kořínky po dvou až třech týdnech kultivace a jejich délka se pohybovala od 3 do 7 cm.

Převod do nesterilních podmínek byl zahájen po třech týdnech kultivace na médiu s ½ koncentrací MS bez růstových regulátorů s přídavkem aktivního uhlí. Rostliny po přesázení do skleníku dosahovaly výšky 20 cm. Po šesti týdnech se rostliny přesazo-

valy do květináčů. Během osmi týdnů narostly na výšku 40ti cm. Odrůda se vyznačovala 100% ujímatelností, vysokou rychlostí růstu a tvorbou kořenů.

## **5.9 Protokol množení *in vitro* pro odrůdu Fortissimo**

Pro sterilizaci byl zvolen časový interval v rozmezí 3 – 11 minut 0,2% HgCl<sub>2</sub> z důvodu malých pupenů.

Pro tuto odrůdu byl vhodný odběr v zimním i letním období, avšak po kultivaci v délce deseti měsíců činil rozdíl v nárůstu explantátů při zimním odběru o 60 % oproti odběru letnímu.

Multiplikační pasážování výhonků probíhalo každé tři týdny na různá média, a to MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA.a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. Média byla střídána podle zasychání spodních lístků.

Jako zakořeňovací médium bylo použito ½ MS bez růstových regulátorů s přísadkou aktivního uhlí. První kořeny se objevily po prvním týdnu kultivace, ale pro dosažení delších kořenů byly prýty ponechány na médiu další dva týdny. Velikost kořenů se pohybovala od 2 do 4 cm.

Růže byly přesázeny do skleníku po třech týdnech. Po dosažení 8cm výšky byly rostliny přesázeny do květináčů po jedenácti týdnech. Delší doba přesazení se odvíjela od pomalého růstu rostlin. Během tří týdnů rostliny dosáhly výšky 13 cm.

## **5.10 Protokol množení *in vitro* pro odrůdu Pastorale**

Čas sterilizace byl zvolen od 3 do 11 minut 0,2% HgCl<sub>2</sub>.

Odběr v zimních měsících nebyl pro tuto odrůdu vhodný z důvodu 0% vzcházení. Letní odběr byl vhodnější, přesto vyrašilo pouze 40% sterilovaných pupenů. Odrůda byla náchylná k nekrotizaci pupenů.

Pro multiplikační pasážování byla použita média MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA.a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. Multiplikované výhonky byly po třech až čtyřech týdnech vždy rozpasážovány.

Fáze zakořeňování a aklimace nebyla provedena z důvodu pomalé multiplikace rostlin, a tudíž nedostatečnému množství prýtů.



## 5.11 Protokol množení *in vitro* pro odrůdu Julius Fabianics de Misefa

Nodální segmenty byly sterilizovány po dobu 3 – 11 minut v 0,2% chloridu rtuťnatém.

U této odrůdy nebyly shledány rozdíly rašení pupenů při kultivaci z letního či zimního odběru.

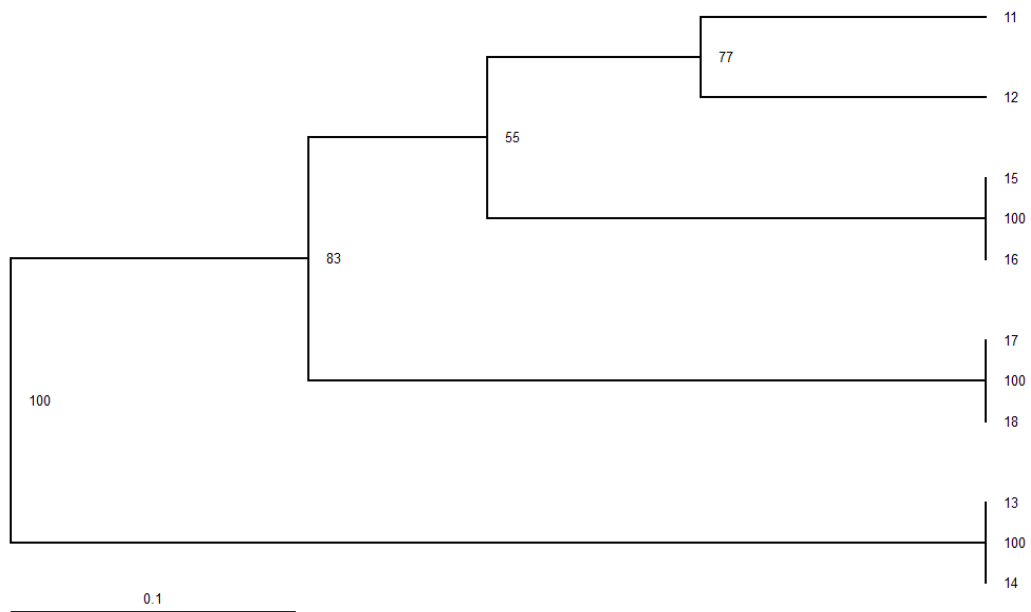
Pro multiplikační pasážování byla použita média MS s 2 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, MS s 0,7 mg.l<sup>-1</sup>BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup>IBA WPM s 1,7 mg.l<sup>-1</sup> BA. Podle velikosti a množství namnožených výhonů byla pasáž prováděna v rozmezí třech až čtyř týdnů.

Zakořeňování odrůdy probíhalo na médiu ½ MS bez růstových regulátorů s přidavkem aktivního uhlí. Dobře vyvinutý kořenový systém měly růže po třech týdnech kultivace.

Převod na zahradnický substrát s perlitem byl uskutečněn po třech týdnech kultivace na zakořeňovacím médiu. Ze skleníku byly 5 – 8 cm velké rostliny přesázeny do květináčů. Po třech týdnech dosáhly některé výhony výšky 15 cm.

## 5.12 DNA analýza

Pro ověření stability explantátových kultur odrůd Klimentina, Jan Palach, Fortissimo a Julius Fabianics de Misefa byly použity DNA markery. Nejvíce odlišná je odrůda Jan Palach od ostatních odrůd, které si byly podobné. Geneticky nejpodobnější si jsou odrůdy Klimentina a Fortissimo. Vznikly tedy dva klastery (obrázek č. 57), z nichž jeden klaster se dělí na dva podklastery. Byla zjištěna shoda DNA donorových rostlin a explantátů až na odrůdu Klimentina, u které se donorová rostlina od explantátu lišila. Předpokládám, že došlo k záměně vzorku – a v budoucnu bude vzorek opakován.



Obrázek č. 57: Dendrogram podobnosti

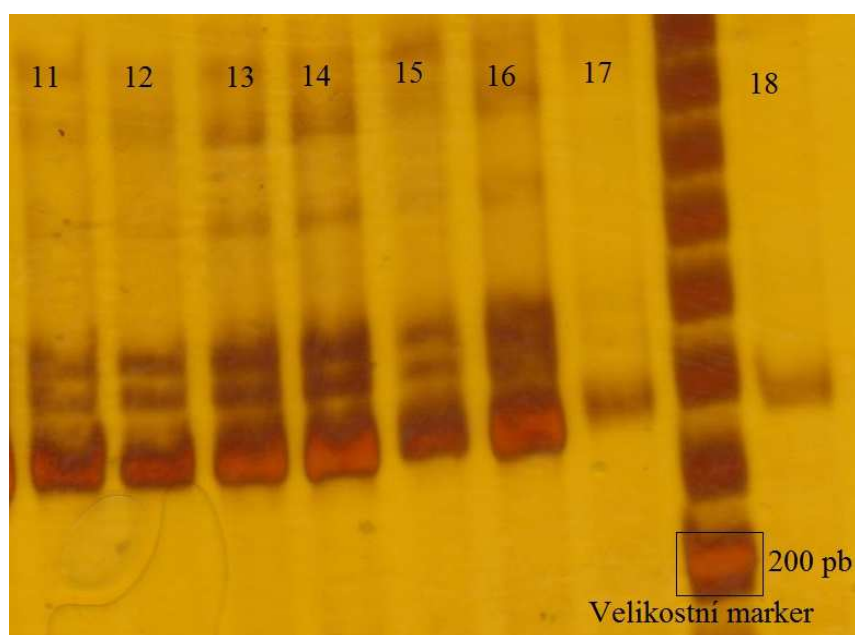
Zkratky: 11 – odrůda Klimentina donor, 12 – odrůda Klimentina explantát, 13 – odrůda Jan Palach donor, 14 - odrůda Jan Palach explantát, 15 – odrůda Fortissimo donor, 16 – odrůda Fortissimo explantát, 17 – odrůda Julius Fabianics de Misefa donor, 18 – odrůda Julius Fabianics de Misefa

Během hodnocení SSR markerů byl průměrný počet tři alely na lokus (tabulka č. 6). Velikost jednotlivých produktů byla určena v rozmezí 180 – 240 párů bazí (obrázek č. 58). Průměry hodnot byly DI (diversity index) – 0,59, PI (pravděpodobnost identity) – 0,21 a PIC (polymorfní informační obsah) – 0,54.



Tabulka 6: Vyhodnocení SSR markerů

SSR primer	velikost (pb)	počet alel	DI	PI	PIC
CL2980	180 - 220	3	0,63	0,20	0,56
C187	180 - 220	3	0,57	0,23	0,51
H20D08	220 - 240	3	0,56	0,25	0,50
H9B01	200 - 230	4	0,7361111	0,0766782	0,7082369
H22C01	220 - 240	3	0,65625	0,1137695	0,6210938
C139	230 - 240	2	0,375	0,4609375	0,3046875
H9B07	200 - 230	3	0,625	0,1484375	0,5859375
H4F06	200 - 230	3	0,56	0,248	0,5024
<b>průměr</b>	-	<b>3</b>	<b>0,59</b>	<b>0,21</b>	<b>0,54</b>



Obrázek č. 58: Polyakrilamidový gel

Zkratky: 11 – odrůda Klimentina donor, 12 – odrůda Klimentina explantát, 13 – odrůda Jan Palach donor, 14 - odrůda Jan Palach explantát, 15 – odrůda Fortissimo donor, 16 – odrůda Fortissimo explantát, 17 – odrůda Julius Fabianics de Misefa donor, 18 – odrůda Julius Fabianics de Misefa

## 6 ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na založení explantátové kultury vybraných odrůd růží. Založení primární kultury i další růst *in vitro* jednotlivých odrůd ovlivňuje doba odběru explantátu.

Některé odrůdy reagovaly lépe na zimní odběr (Jan Palach, Fortissimo a Julius Fabianics de Misefa), ale jiné rychleji vzcházely po letním odběru (Klimentina, Pastorale). Odrůdu Pastorale se z odebraných pupenů v zimním období nepodařilo do podmínek „*in vitro*“ převést.

Segmenty růží byly sterilizovány 0,2% roztokem chloridu rtuťnatého v době 3 – 13 minut dle síly a vyzrálosti odebraného materiálu.

Pro multiplikaci odrůd růží „*in vitro*“ byla vybrána tři média s rozdílným složením růstových regulátorů. Byla to média Murashige a Skoog (1962), které bylo použito dvakrát s různým složením růstových regulátorů a Wood plant medium (1980). Optimální bylo střídání jednotlivých médií během kultivace.

Pro fázi zakořeňování byla použita média Murashige a Skoog (MS) se sníženým obsahem sacharózy na 2% a medium MS o poloviční koncentraci bez růstových regulátorů s přídavkem aktivního uhlí.

Aklimace byla provedena u čtyř odrůd, a to u odrůdy Klimentina, Jan Palach, Fortissimo a Julius Fabianics de Misefa. Tato fáze byla úspěšná průměrně z 90%.

Genová banka – dlouhodobá kultivace při nízkých teplotách - byla zakládána na médiu MS s 2% sacharózy bez růstových regulátorů. Toto médium bylo vybráno jako nejlepší ze čtyř zkoušených médií. Po dvou měsících kultivace při teplotě 6 – 8°C byla kultivace stále 100%.

Analýzy DNA potvrdily očekávané výsledky. Shoda donorových rostlin a explantátů byla 100% až na odrůdu Klimentina, kde je pravděpodobné, že došlo k záměně vzorků.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

1. All About Agar. *Science Buddies* [online]. 2002 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: [http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project\\_ideas/MicroBio\\_Agar.shtml](http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Agar.shtml)
2. BAIG, M. M. Q., I. A. HAFIZ, HUSSAIN, T. AHMAD a N. A. ABBASI. An efficient protocol for in vitro propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia*. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2011, č. 22 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/94118>
3. CARELLI, B.P. a S. ECHEVERRIGARAY. An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae* [online]. 2002, č. 92 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423801002801>
4. EHSANPOUR, A. A. a R. RAZAVIZADEH. Optimization of In vitro propagation of *Rosa hybrida* L. cultivar Black Red. *American-urasian journal of agricultural & environmental sciences* [online]. 2008, č. 3 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: [http://www.idosi.org/aejaes/jaes3\(1\)/14.pdf](http://www.idosi.org/aejaes/jaes3(1)/14.pdf)
5. HAVLŮ J., B. JAŠA aj. KLIMEŠ. *Růže královna květin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1977, 347 s.
6. HIBRAND-SAINT OYANT, L., L. CREPEL, S. RAJAPAKSE, L. ZHANG a F. FOUCHER. Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. *Tree Genetics & Genomes*. 2008, č. 4.
7. HRADILÍK, J. *Rostlinné explantáty*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005, 85 s. ISBN 80-715-7915-7.
8. JABBARZADEH, Z. a M. KHOSH-KHUI. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Scientia Horticulturae* [online]. 2005, č. 105 [cit.

2015-03-15].

Dostupné

z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423805000695>

9. JAŠA B. a B. ZAVADIL. Encyklopedie růží. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2008, 214 s. ISBN 978-802-5123-225.
10. LLOYD, G. a B. McCOWN. Commercially - feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 1980, č. 30.
11. MARKLEY, R. *Růže: nepřehledné bohatství tvarů a barev*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub, 2009, 144 s. ISBN 978-802-4223-360.
12. MAURYA, R. P., R.C. YADAV, N. R. GODARA a V. S. BENIWAL. In vitro plant regeneration of rose (*Rosa hybrida* L.) cv. „Benjamin Paul“ through various explants. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* [online]. 2013, č. 1 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.jebas.org/wp-content/uploads/2014/09/Maurya-et-al-JEBAS.pdf>
13. MEISL, T. *Explantátová kultivace růží a možnosti komerčního využití*. Lednice na Moravě, 1997. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
14. Meristem. Encyclopædia Britannica, Inc. [online]. 2015 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/376101/meristem>
15. *Množení dřevin hřížením* [online]. 29.7.2009 [cit. 2015-03-06]. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/5586-mnozeni-drevin-hrizenim/>
16. NIKBAKHT, A., M. KAFI, M. MIRMASOUMI a M. BABALAR. Micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. *International journal of agriculture & biology* [online]. 2005, č. 7 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: [http://www.fspublishers.org/published\\_papers/64871\\_..pdf](http://www.fspublishers.org/published_papers/64871_..pdf)
17. NOVÁK, F. J. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1990, 208 s. ISBN 80-200-03444-4.

18. NOODEZH, H. M., A. MOIENI a A. BAGHIZADEH. In vitro propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* [online]. 2012, č. 5 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-012-9454-z>
19. Očkování rostlin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 31. 1. 2015 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/O%C4%8Dkov%C3%A1n%C3%AD\\_rostlin](http://cs.wikipedia.org/wiki/O%C4%8Dkov%C3%A1n%C3%AD_rostlin)
20. Ochrana genofondu rostlin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2012 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Ochrana\\_genofondu\\_rostlin](http://cs.wikipedia.org/wiki/Ochrana_genofondu_rostlin)
21. PATI, P. K., S. P. RATH, M. SHARMA, A. SOOD a P. S. AHUJA. In vitro propagation of rose – a review. *Biotechnology Advances* [online]. 2006, č. 24, 2015 [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975005000996>
22. PROCHÁZKA, S. a J. ŠEBÁNEK. *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1997, 395 p. ISBN 80-200-0597-8.
23. RICHTER, G. a T. PROLL. *Růže*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 2008, 96 s. ISBN 978-80-242-2090-1.
24. ROUT, G.R., P. DAS, J. MOTTLEY a S. SAMANTARAY. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae* [online]. 1999, č. 81, 2015 [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423899000254#>
25. Růže. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 11. 10. 2014 [cit. 2015-01-30]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/R%C5%AF%C5%BEE>
26. SENAPATI, S. K. a G. R. ROUT. Study of culture conditions for improved micro-propagation of hybrid rose. *Scientia Horticulturae* [online]. 2008, č. 35 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00764.pdf>

27. SMÝKAL, P. Jak to chodí v genových bankách rostlin?. *21.století* [online]. 2008 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://21stoleti.cz/2008/06/19/jak-to-chodi-v-genovych-bankach-rostlin/>
28. Somatic embryogenesis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2015 [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Somatic\\_embryogenesis](http://en.wikipedia.org/wiki/Somatic_embryogenesis)
29. ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK A V. RŮŽIČKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
30. Šípky. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 1. 2015 [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0%C3%ADpky>
31. TRIGIANO, R. a D. J. GRAY. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011, xviii, 583 p. ISBN 978-142-0083-262.
32. VERMEULEN, N. *Encyklopedie růží*. 1. vyd. Čestlice: Rebo, 2003, 320 s. ISBN 80-723-4265-7.
33. VĚTVIČKA, V. *Růže*. Vyd. 1. Praha: Aventinum, 2002, 224 s. ISBN 80-715-1183-8.
34. VILKUS, E. *Roubování a očkování*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 88 s. + 6 s. přílohy. ISBN 80-247-0539-7.
35. WALTER, V. *Růže: [rady pěstitelům]*. Vyd. 2. Praha: Aventinum, 2005, 192 s. ISBN 80-715-1247-8.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Tvary kališních lístků

Obrázek č. 2: Tvary květů

Obrázek č. 3: Tvary listů a lístků

Obrázek č. 4: Tvary ostnů

Obrázek č. 5: Tvary plodů tzv. botanických druhů růží

Obrázek č. 6: Tvary plodů ušlechtilých růží

Obrázek č. 7: Některé růže se podzemními výběžky rozrůstají do velkých polykormonů

Obrázek č. 8: Postup při očkování ušlechtilých růží na podnož

Obrázek č. 9: Očkování metodou Forkertovou

Obrázek č. 10: Rozmnožování sadové růže hřížením

Obrázek č. 11: Habitus odrůdy Klimentina

Obrázek č. 12: Květ odrůdy Klimentina

Obrázek č. 13: Habitus odrůdy Jan Palach

Obrázek č. 14: Květ odrůdy Jan Palach

Obrázek č. 15: Habitus odrůdy Fortissimo

Obrázek č. 16: Květ odrůdy Fortissimo

Obrázek č. 17: Habitus odrůdy Pastorale

Obrázek č. 18: Květ odrůdy Pastorale

Obrázek č. 19: Habitus odrůdy Julius Fabianics de Misefa

Obrázek č. 20: Květ odrůdy Julius Fabianics de Misefa

Obrázek č. 21: Odrůda Jan Palach – médium H – 4 týdny kultivace

Obrázek č. 22: Odrůda Jan Palach – médium H – 4 týdny kultivace

Obrázek č. 23: Odrůda Jan Palach po vylahvování

Obrázek č. 24: Odrůda Jan Palach po šesti týdnech

Obrázek č. 25: Odrůda Klimentina po vylahvování

Obrázek č. 26: Odrůda Klimentina po šesti týdnech

Obrázek č. 27: Odrůda Fortissimo po vylahvování

Obrázek č. 28: Odrůda Fortissimo po jedenácti týdnech

Obrázek č. 29: Odrůda Julius Fabianics de Misefa po vylahvování

Obrázek č. 30: Odrůda Julius Fabianics de Misefa po jedenácti týdnech

Obrázek č. 31: Odrůda Jan Palach H 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 32: Odrůda Jan Palach H 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 33: Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 34: Odrůda Jan Palach MS 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 35: Odrůda Fortissimo H 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 36: Odrůda Fortissimo H 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 37: Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 38: Odrůda Fortissimo MS 5% sacharóza, 3% manóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 39: Odrůda Jan Palach H 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 40: Odrůda Jan Palach H 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 41 : Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 42: Odrůda Jan Palach MS 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 43: Odrůda Fortissimo H 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 44: Odrůda Fortissimo H 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 45 : Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 46: Odrůda Fortissimo MS 5% sacharóza, 3% manóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 47: Odrůda Klimentina MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 48: Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 49: Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 50: Odrůda Pastorale MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 51: Odrůda Julius Fabianics de Misefa, MS 2% sacharóza – teplo, světlo  
Obrázek č. 52: Odrůda Klimentina MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 53: Odrůda Jan Palach MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 54: Odrůda Fortissimo MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 55: Odrůda Pastorale MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 56: Odrůda Julius Fabianics de Misefa MS 2% sacharóza – chlad, světlo  
Obrázek č. 57: Dendrogram podobnosti  
Obrázek č. 58: Polyakrilamidový gel



## **9 SEZNAM TABULEK**

Tabulka č. 1: Přehled odrůd růží podle vůně

Tabulka č. 2: Složení základního média Murashige a Skoog (1962)

Tabulka č. 3: Složení média Wood plant medium (WPM)

Tabulka č. 4: Složení PCR reakce

Tabulka č. 5: Složky polyakrylamidového gelu

Tabulka č. 6: Vyhodnocení SSR markerů

## 10 SEZNAM ZKRATEK

2-iP – isopentenyladenin

2,4-D – 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina

ABA – kyselina abscisová

AKRYL/BIS – akrylamid/biakrylamid

APS – amonium persulfát

BA – benzyladenin

BAP – benzylaminopurin

H – médium ½ Murashige a Skoog médium bez růstových regulátorů s přidavkem aktivního uhlí

IAA – indol-3-ocetová kyselina

IBA – indol-3-pyruvátová kyselina

MS – Murashige a Skoog médium

MSM – Murashige a Skoog médium s 0,7 mg.l<sup>-1</sup> BA a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA

NAA – naftol-1-acetová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

TBE – trishydroxymethylaminomethan

TEMED – tetramethylendiamin

UPGMA – metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů

WPM – wood plant médium

## 11 PŘÍLOHY

### Seznam příloh:

Příloha č. 1: Tabulky

Tabulka č. 1: Výsledky sterilizace

Tabulka č. 2: Hodnocení znaků u odrůdy Jan Palach při 6 – 8 °C

Tabulka č. 3: Hodnocení znaků u odrůdy Jan Palach při 23°C

Tabulka č. 4: Hodnocení znaků u odrůdy Fortissimo při 6 – 8 °C

Tabulka č. 5: Hodnocení znaků u odrůdy Fortissimo při 23 °

Tabulka č. 6: Výsledky kontroly pro genobanku

Tabulka č. 7: Výsledky zkoušeného média pro genobanku

Tabulka č. 8: Sumární tabulka pro množení jednotlivých odrůd *in vitro*

Příloha č. 2: Poster – prezentace pro Floru Olomouc – březen 2015

## Příloha č. 1: Tabulky

Tabulka č. 1: Výsledky sterilizace

Odrůda	% rostoucích explantátů	% nekrotizovaných explantátů	% kontaminovaných explantátů
Klimentina	60	20	20
Jan Palach	100	0	0
Fortissimo	100	0	0
Pastorale	20	60	20
Julius Fabianics de Misesfa	60	40	0

Tabulka č. 2: Hodnocení znaků u odrůdy Jan Palach při 6 – 8 °C

Odrůda Jan Palach – chlad a světlo				
Hodnocené znaky	Zkoušená média			
	H 2% sacharóza	H 3% manóza 5% sacharóza	MS 2% sacharóza	MS 3% manóza 5% sacharóza
Vzrůst	Malý – cca 1cm	-	Malý – cca 1,5cm	Malý – cca 1cm
Zakořenění	100%	-	66,67%	100%
Délka kořenů	1cm	-	3cm	1,5cm
Tvorba kalusu	-	100%	-	-
Zasychání listů	-	-	-	-

Tabulka č. 3: Hodnocení znaků u odrůdy Jan Palach při 23°C

<b>Odrůda Jan Palach – teplo a světlo (kontrola)</b>				
<b>Hodnocené znaky</b>	<b>Zkoušená média</b>			
	H 2% sa- charóza	H 3% manóza 5% sacharóza	MS 2% sacha- róza	MS 3% manóza 5% sacharóza
<b>Vzrůst</b>	Vysoký – cca 3,5cm	Malý – cca 1,5cm	Malý – cca 1,5cm	Malý – cca 1cm
<b>Zakořenění</b>	100%	66,67%	33,33%	66,67%
<b>Délka kořenů</b>	1,5-6cm	1,5-3cm	1-3cm	1,5 – 3cm
<b>Tvorba kalusu</b>	-	-	-	-
<b>Zasychání listů</b>	-	ano	ano	ano

Tabulka č. 4: Hodnocení znaků u odrůdy Fortissimo při 6 – 8 °C

<b>Odrůda Fortissimo – chlad a světlo</b>				
<b>Hodnocené znaky</b>	<b>Zkoušená média</b>			
	H 2% sa- charóza	H 3% manóza 5% sacharóza	MS 2% sacharóza	MS 3% manóza 5% sacharóza
<b>Vzrůst</b>	Malý – cca 1cm		Malý – cca 1,5cm	Malý – cca 1cm
<b>Zakořenění</b>	-	25%	-	-
<b>Délka kořenů</b>	-	1-2cm	-	-
<b>Tvorba kalusu</b>	50%	75%	-	-
<b>Zasychání listů</b>	Ano – 50%	-	ano	ano

Tabulka č. 5: Hodnocení znaků u odrůdy Fortissimo při 23 °C

<b>Odrůda Fortissimo – teplo a světlo (kontrola)</b>				
<b>Hodnocené znaky</b>	<b>Zkoušená média</b>			
	H 2% sacharóza	H 3% manóza 5% sacharóza	MS 2% sacharóza	MS 3% manóza 5% sacharóza
<b>Vzrůst</b>	cca 2cm	-	cca 2,5cm	cca 2cm
<b>Zakořenění</b>	100%	-	100%	-
<b>Délka kořenů</b>	2cm	-	2cm	-
<b>Tvorba kalusu</b>	-	-	-	-
<b>Zasychání listů</b>	ano	-	ano	ano

Tabulka č. 6: Výsledky kontroly pro genobanku

	<b>MS 2% sacharóza – teplo a světlo</b>				
<b>Hodnocené znaky</b>	Klimentina	Jan Pálach	Fortissimo	Pastorale	Julius F de Misefa
<b>Vzrůst</b>	2 – 3 cm	1 – 2 cm	1 – 2 cm	1,5 – 3 cm	1,5 – 3 cm
<b>Zakořenění</b>	60%	40%	60%	100%	60%
<b>Délka kořenů</b>	1 – 4 cm	1 – 4 cm	1 – 2,5 cm	0,5 – 6 cm	0,5 – 1 cm
<b>Tvorba kalusu</b>	-	-	-	-	-
<b>Známky zasychání listů</b>	ano	ano	ano	ano	ano

Tabulka č. 7: Výsledky zkoušeného média pro genobanku

	<b>MS 2% sacharóza – chlad a světlo</b>				
<b>Hodnocené znaky</b>	Klimentina	Jan Palach	Fortissimo	Pastorale	Julius F. de Misefa
<b>Vzrůst</b>	1 – 2 cm	1 – 2 cm	1 – 2 cm	1 – 2 cm	1,5 – 3 cm
<b>Zakořenění</b>	40%	50%	30%	20%	-
<b>Délka kořenů</b>	1 – 4 cm	1 – 4 cm	0,5 – 1,5 cm	0,5 – 1 cm	-
<b>Tvorba kalusu</b>	-	-	-	-	-
<b>Známky zasy- chání listů</b>	ne	ne	ano	ano	ne

Tabulka č. 8: Sumární tabulka pro množení jednotlivých odrůd *in vitro*

Odrůda	Odběr	Sterilizace 0,2% HgCl <sub>2</sub> (mi- nuty)	Media MS 2BA/0,1 NAA, 0,7BA/0,1 IBA, WPM 1,7 BA Přepasážíování/ mno- žitelský koeficient	Zakořeňování ½ MS bez RR doba/ délka kořenů cm	Převod na množárnu	Přesazení/ vzrůst/ ujímatelnost
<b>Klimentina</b>	letní	3 – 13	4 týdny/ 2	3 týdny/3	6 týdnů	8 týdnů/ 30 cm vzrůst/ 100 %
<b>Jan Palach</b>	zimní	5 – 13	3 týdny/3	2 týdny/5	6 týdnů	8 týdnů/40 cm vzrůst /100%
<b>Fortissimo</b>	zimní/ letní	3 – 11	3 týdny/2	3 týdny/3	11 týdnů	3 týdny/11 cm vzrůst/80%
<b>Pastorale</b>	letní	3 – 11	3 – 4 týdny/2	-	-	-
<b>Julius Fabianics de Misefa</b>	zimní/ letní	3 – 11	3 – 4 týdny/2	3 týdny/1	12 týdnů	3 týdny/ 15 cm vzrůst/ 100%



**Záchrana genofondu vybraných starých odrůd růží z areálu Flora Olomouc pomocí množení *in vitro*.**

Helena Fišerová, Zuzana Staňková, Pavla Remerová, Ondřej Vícha, Tomáš Vyhnánek



- 1-Primární kultura
- 2-Multiplikační fáze
- 3-Udržovací fáze
- 4-Zakořeňovací fáze
- 5-Převod *in vivo*
- 6-Kontrola identity převedené rostliny s matečnou rostlinou

Jan Palach - 15

Fortissimo - 18

Klimentina - 11

Pastorale - 25

Julius FabianiCs - 27