

MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

Zahradnická fakulta v Lednici

**MULTIPLIKACE ČESNEKU KUCHYŇSKÉHO (*Allium sativum* L.)
V PODMÍNKÁCH IN VITRO**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Martina Kudělková

Vypracoval:

Ondřej Palíšek

LEDNICE 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Ondřej Palíšek**
Studijní program: Zahradnické technologie
Obor: Zahradnictví
Konzultant: Ing. Eva Ondrušiková, CSc.
Název tématu: **Multiplikace česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.) v podmínkách in vitro**
Rozsah práce: 30

Zásady pro vypracování:

1. V první části student vypracuje charakteristiku rod *Allium* L. z hlediska botanického a významu pěstování s užším zaměřením na česnek kuchyňský.
2. Náplní druhé části bude studium kultivace česneku kuchyňského v podmínkách in vitro.
3. V poslední části bude prostudováno složení kultivačních médií pro multiplikaci česneku kuchyňského.

Seznam odborné literatury:

1. *Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách in vitro*. KŘIŽAN, B. – ONDRUŠIKOVÁ, E. – KUDĚLKOVÁ, M. – WASSERBAUEROVÁ, L. – KRAJÍČKOVÁ, J. – SMÉKALOVÁ, K. – DUŠEK, K. 2010.
2. FIŠEROVÁ, H. – SPÁLOVSKÝ, M. – STAŇKOVÁ, Z. – KOZÁK, V. – KUDĚLKOVÁ, M. – KŘIŽAN, B. – HAVEL, L. Role etylenu při kultivaci česneku v podmínkách in vitro. *Úroda*. 2012. sv. 60, č. 9, s. 20–24. ISSN 0139-6013.
3. NAUŠOVÁ, O. – KUČEROVÁ, Z. – ONDRUŠIKOVÁ, E. – KŘIŽAN, B. – WASSERBAUEROVÁ, L. – SOUKUPOVÁ, J. – KARLOVÁ, K. – STAVĚLÍKOVÁ, H. – DUŠEK, K. Zhodnocení účinnosti metody izolace meristému při ozdravování 20 odrůd česneku. In ŘEHOUT, V. *Biotechnology 2008*. 1. vyd. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, 2008, s. 193–195. ISBN 80-85645-58-0.
4. AYABE M., SUMI S. (2001): A novel efficient tissue culture method – “stem – disc dome culture” – for producing virus – free garlic (*Allium sativum* L.), *Plant Cell Rep* (2001) 20:503 – 507.

Datum zadání bakalářské práce: prosinec 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015

L. S.



Ondřej Palíšek
Autor práce



Ing. Martina Kudělková
Vedoucí práce



Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem práci: **Multiplikace česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.) v podmínkách *in vitro*** vypracoval/a 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 *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, 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 Lednici, dne 19. dubna 2015:

.....
podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval především vedoucí mé bakalářské práce Ing. Martině Kudělkové za ochotnou pomoc a trpělivost při vedení a zpracování bakalářské práce, a dále všem, kteří mi pomáhali a poskytovali odborné rady a informace.

Obsah

1.	ÚVOD	9
2.	CÍL PRÁCE.....	10
3.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1.	Botanická charakteristika rodu <i>Allium</i> Mill.	11
3.2.	Druhy rodu <i>Allium</i>	12
3.3.	Popis druhu <i>Allium sativum</i> (L.) a aspekty jeho kultivace	13
3.4.	Kultivace česneku kuchyňského v podmínkách <i>in vitro</i>	20
3.4.1.	Historie kultivace rostlin <i>in vitro</i>	20
3.4.2.	Multiplikace česneku kuchyňského	21
3.4.	Typy multiplikace vhodné pro česnek kuchyňský	24
3.5.1.	Somatická embryogeneze	24
3.5.2.	Multiplikace pomocí mechanického dělení	24
3.5.3.	Kultury z kořenových špiček	25
3.5.4.	Kultury stonkových disků	25
3.5.5.	Meristemové kultury	26
3.6.	Studium složení kultivačních médií pro multiplikaci česneku kuchyňského	27
3.6.1.	Makroelementy	27
3.6.2.	Mikroelementy	29
3.6.3.	Cukry	29
3.6.4.	Vitamíny	29
3.6.5.	Nedefinované složky	29
3.6.6.	Růstové regulátory	30
3.6.7.	Auxiny	30
3.6.8.	Cytokininy	31
3.6.9.	Gibereliny	31
3.6.10.	Inhibitory růstu	31

3.6.11	Aktivní uhlí.....	32
3.6.12	pH média.....	32
3.6.13	Voda.....	32
3.6.14	Zpevnění média	32
3.7	Příprava kultivačních médií.....	34
3.7.1	Růstové regulátory.....	34
3.7.2	Sterilita.....	34
3.7.3	Znehodnocení založené kultury.....	35
3.8	Další faktory ovlivňující růst kultury	36
3.8.1	Teplo	36
3.8.2	Světlo	36
3.8.3	Prevence hyperhydricity	36
3.8.4	Tvorba cibule a převod rostlin do nesterilních podmínek	37
3.9	Genetická nestabilita explantátových kultur	38
4	Vlastní komentář k řešené problematice	39
5	Závěr.....	40
6	Souhrn	42
7	Resume	43
8	Seznam použité literatury a informačních zdrojů.....	44

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MS – médium Murashige Skoog (1962)

LS – médium Linsmaier Skoog (1965)

WPM - médium Lloyd a McCown (1980)

IBA–indolyl-3-máselná kyselina

IAA – indolyl-3-octová kyselina

2,4-D – dichlorfenoxyoctová kyselina

BAP - benzylaminopurin

BA - benzyladenin

GA₃– kyselina giberelinová

KIN – kinetin, fufrurylminopurin

2-iP – izopentenyladenin

4-CPA -kyselina chlorfenoxyoctová

2,4,5-T kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová

dicamba - kyselina 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová

picloram - kyselina 4-amino3,5,6-trichlorpikolinová

CCC - chlorcholinchlorid

1. ÚVOD

Česnek kuchyňský je zařazen mezi zeleninu, ale je spíše užíván jako koření a léčivo. Netvoří semena a množí se pouze vegetativně, a proto je napadán řadou virůsnižujících produkci. Pro ozdravení kultur česneku je nutné najít vhodnou metodu kultivace a multiplikace *in vitro*.

Množení rostlin metodou multiplikace *in vitro* je stále více využíváno nejen ve výzkumu, ale i v komerčním množení rostlin. Výhodou multiplikace je to, že můžeme z velmi malé části rostlinného pletiva kultivovat celou rostlinu. To je dáno totipotencí buňky- exprese celé genetické informace nutné k růstu a vývoji buňky.

Metoda multiplikace *in vitro* je cestou vegetativního množení, kdy dopěstované rostliny mají celou genetickou informaci mateřské rostliny se stejným fenotypovým i genotypovým projevem. Touto metodou se dají množit rostliny, které se generativní cestou množí špatně nebo nemnoží vůbec – např. česnek kuchyňský. Pěstování v řízených podmínkách navíc umožňuje celoroční produkci, bývá rychlejší než konvenční množení a šetří místo. Nevýhodou je cena potřebného vybavení laboratoře a chemikálií, nutnost proškoleného personálu a nedostatek informací o množení některých druhů rostlin.

Výhodou množení rostlin *in vitro* je ozdravování od patogenů, zejména od virů. Zvláště u rostlin množících se pouze vegetativní cestou bývá velké procento napadených rostlin, což snižuje produkci. První pokusy s ozdravováním česneku provedl Ing. Pavel Havránek CSc. v letech 1971-1987. Těchto pokusů však bylo zanecháno kvůli rychlé reinfekci ozdraveného materiálu v polních podmínkách.

In vitro kultury mají velký význam pro šlechtění a výzkum rostlin, umožňují dopěstování celých haploidních jedinců z pohlavních buněk či vzniklých fúzí protoplastů. Dále lze indukovat mutace či získávat geneticky modifikované rostliny. Buněčné kultury v bioreaktorech na tekutých médiích mohou být cenným zdrojem sekundárních metabolitů pro farmaceutický průmysl.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je charakterizovat rod *Allium* s užším zaměřením na česnek kuchyňský, shromáždit dostupné informace o jeho kultivaci a multiplikaci v podmínkách *in vitro*. Dalším cílem práce je studium složení kultivačních médií vhodných pro *in vitro* kultivaci česneku a výběr nejvhodnějších živných půd pro jeho multiplikaci.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Botanická charakteristika rodu *Allium* Mill.

Allium Mill. (česnek) je rod jednoděložných rostlin, patřící do třídy *Amaryllidaceae* (Amarylkovité) (PETŘÍKOVÁ A KOL., 2012). Podle taxonomického systému AGP II (Angiosperm Phylogeny Group) je čeleď *Amaryllidaceae* řazena do řádu *Asparagales* (Chřestotvaré).

Jedná se zpravidla o vytrvalé byliny, vzácně dvouleté, s cibulí různé velikosti složené obvykle z 6-11 stroužků, které slouží k vegetativnímu rozmnožování. Rostliny mají květenství i pacibulky. Některé druhy schopnost generativního rozmnožování ztratily a vytváří pouze pacibulky. Listy, zpravidla nahlučené na bázi, jsou ploché, duté, trubkovité, polooblé až smáčknuté, přisedlé nebo vzácně řapíkaté (*Allium ursinum*) (KUBÁT, 2010). Čepele listů jsou celokrajné, čárkovité až kopinaté. Žilnatina je souběžná. Rostliny z rodu *Allium* jsou jednodomé s oboupohlavními květy. Květenstvím je lichookolík. Pod květenstvím bývají dva listeny (vzácně jeden), ve tvaru toulce. Někdy bývají listeny navzájem srostlé. V květenství někdy bývají přítomné pacibulky, které slouží k vegetativnímu rozmnožování. V některých případech květenství zcela chybí a jsou přítomny pouze pacibulky. Tvorba pacibulek má různé příčiny, většinou genetického charakteru nebo mohou být vyvolány virózami. Tyčinek je 6 ve dvou přeslenech, zpravidla 3+3, jsou na bázi srostlé, často i vzájemně. Tyčinky vnějšího a vnitřního kruhu mohou být odlišné. Synkarpní gyneceum je srostlé ze 3 plodolistů. Semeník je svrchní. Plodem je suchá, pukavá tobolka, otevírající se segmenty, ve kterých je většinou 6 semen. Semena jsou hranatá, černá, s reliefem. Rostliny vynikají obsahem látek se sirnými vazbami, které tvoří základ charakteristických silic (MACISEFEROGULLARI., 2005). Toto je nejvíce vyvinuto u druhů *Allium sativum*, *Allium cepa* a *Allium ursinum*.

3.2. Druhy rodu *Allium*

Na světě je známo 660 druhů rodu *Allium* rozšířených po Evropě, Asii, Severní Americe, méně často po Africe, Střední a Jižní Americe. Vzhled jednotlivých druhů je velice rozdílný, vzrůst může být od 10 do 150cm. Jedním z největších zástupců je česnek obrovský (*Allium giganteum*). Dále se jednotlivé druhy výrazně liší barvou květů, která může být žlutá, modrá či růžová (KONVIČKA, 1998).

V České republice je rozšířeno přibližně 17 druhů česneku – česnek medvědí (*Allium ursinum*), česnek tuhý (*Allium strictum*), česnek šedý horský (*Allium senescens*), česnek hranatý (*Allium angulosum*), česnek kulovitý (*Allium rotundum*), pór zahradní (*Allium porruum*), pažitka pobřežní (*Allium schoenoprasum*), cibule zimní (*Allium fistulosum*), cibule kuchyňská (*Allium cepa*), česnek žlutý (*Allium flavum*), česnek viničitý (*Allium vineale*), česnek kulatohlavý (*Allium sphaerocephalon*), česnek podivný (*Allium paradoxum*), česnek ořešec (*Allium scorodoprasum*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*), česnek kýlnatý (*Allium carinatum*) a česnek pravý (*Allium oleraceum*).

Některé druhy rodu *Allium* jsou využívány jako okrasné rostliny v zahradní architektuře kvůli své barvě nebo velikosti, či k řezu. Patří mezi ně například *Allium flavum*, *Allium christophii*, *Allium molly*, *Allium giganteum*, *Allium odorum*. (KUBÁT, 2010).

3.3. Popis druhu *Allium sativum* (L.) a aspekty jeho kultivace

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* [L.]) patří do čeledi *Amaryllidaceae* (Amarylkovité). Je využíván jako zelenina, koření i léčivá rostlina. Je to jedna z nejstarších kulturních rostlin, stejně jako v minulosti tak i dnes je vysoce ceněna. Užitečnou částí rostliny je cibule složená z různého počtu stroužků. Rozlišují se sortotypy: paličáky (modré zimní česneky), širokolisté nepaličáky (bílé zimní česneky) a úzkolisté nepaličáky (bílé jarní česneky). Původní rozšíření česneku není přesně známé, ale pochází pravděpodobně z divoce rostoucího česneku (*Allium longicuspis*) ze Střední Asie. Během šlechtění ztratil schopnost generativního množení, proto je množen výhradně vegetativně výsadbou ze stroužků. Pomocí vegetativního rozmnožování je přenášena řada virů, které negativně ovlivňují výnos a kvalitu. Proto je nutné najít vhodný způsob pro ozdravení česneku.

Botanické zařazení

Dle Petříkové a kol. 2012 je česnek kuchyňský botanicky řazen následovně:

Říše *Plantae* – rostliny

Oddělení *Magnoliophyta* – rostliny krytosemenné

Třída *Liliopsida* – rostliny dvouděložné

Řád *Asparagales* – chřestotvaré

Čeď *Amaryllidaceae* – amarylkovité

Druh *Allium sativum* (L.) – česnek kuchyňský

Druh *Allium sativum*, česnek kuchyňský

Vědecká synonyma

V současné době existuje pro druh *Allium sativum* (L.) velké množství synonym. Jako příklady synonym lze zmínit *Porrum sativum* (L.) Rchb., *Porrum ophioscorodon* (Link) (Rchb.), *Allium pekinense* Prokh., *Allium ophioscorodon* (Link.). (The Plant List, 2013)

Morfologie

Hlavní orgány rostliny jsou kořen, podpučí, listy, kolaterální pupeny, stonk a květenství. Z pupenu vyrůstají listy, tvoří se stroužky, odehrává se v něm regulace výživy a ukládání rezerv, vyrůstá z něj lodyha.

Kořenový systém česneku je svazčitý, jeho rozvoj závisí na typu česneku, stádiu růstu, době výsadby, velikosti vysazeného stroužku, odrůdě. U ozimých odrůd se tvoří kořenový systém slabší. U forem s užším typem listu bývají kořeny rozvinuty silněji a hlouběji (KONVIČKA, 1998).

Cibule jsou zásobním a rozmnožovacím orgánem česneku. Vytváří se z kolaterálních pupenů podpučí. Tvar a barva stroužků je závislá na jejich uložení v cibuli. Barva bývá špinavě bílá, narůžovělá, fialová. Cibule je složená ze stroužků. Skupiny stroužků jsou od sebe odděleny šupinami listových pochev. Zvláštností jsou celistvé stroužky, které vznikají po výsadbě nevernalizovaných stroužků a pacibulek (Stavělíková, 2008). Cibule dorůstají do hmotnosti 0,5-30g. Vegetační vrchol – pupen je útvar uvnitř stroužku, chráněný dužnatým zásobním listem. Ve zralých cibulích je nové podpučí odděleno od starého korkovou vrstvou. Tento orgán je spleť cévních svazků a pletiv s návazností na kořenový systém. Podpučí zprostředkovává propojení mezi lodyhou, listy a kořeny. Přímě na něm se tvoří listy, kolaterální pupeny a kořeny (STAVĚLÍKOVÁ, 2008).

Listy česneku jsou uspořádány pochvami kolem stonku. Počet závisí na velikosti vysazeného stroužku, velikosti puku a odrůdě. U typu H se tvoří 8-11 listů, u typu A a U 10-15 listů (KONVIČKA, 1998). Jsou čárkovité, hladké, žlábkovité, světle až sytě zelené. Délka je v rozmezí 20-50cm. U nepaličáku listy v době zralosti poléhají, u paličáku je znakem zralosti žloutnutí 2-3 horních listů (KONVIČKA, 1998).

Květonosná lodyha se vyvíjí z terminálního vrcholu podpučí uvnitř puku. Je zakončena květenstvím obaleným toulcem. Výška stonku je podle kultivaru

40 až 200 cm. Stonek je plný. Lichoookoličnaté květenství je složitý útvar kulovitého tvaru. V něm jsou vytvářeny květní pacibulky. Květy jsou stěsnány mezi pacibulkami a většinou dojde k jejich rozvoji. Květní pacibulky jsou vegetativní orgány, které nevznikly pohlavní cestou. Jejich počet v květenství dosahuje až několika set. Tvorbu pacibulek lze považovat za kompenzační mechanismus při selhání semenné produkce (KONVIČKA, 1998). Květní pacibulky se u jednotlivých klonů vyznačují charakteristickým tvarem, barvou a velikostí. Květ česneku kuchyňského nepáchne, narozdíl například od květu česneku medvědího (*Allium ursinum*).

Květ česneku je 4-6mm velký, má 6 tyčinek a 6 okvětních lístků. Tyčinky česneku jsou asi 2mm velké. U sterilních forem jsou prašníky žlutozelené barvy, u bezporuchových květů se prašníky barví fialově. Barevné přechody mezi těmito dvěma formami ukazují na stupeň sterility. Zbarvení prašníků je červenofialové, jsou turgescenční a lesklé, a v době zrání pukají v důsledku kohezního mechanismu podélnou štěrbinou. Sterilní prašníky jsou žlutozelené, svaštělé, matné, bez schopnosti normálního otevření. Pyl česneku má bílou barvu. Přenesením pylu na jiné příbuzné druhy dochází k mezidruhovému křížení. Semeník (tobolka) je dvoupouzdrý a má po dvou semenech v pouzdře. Kvetení česneku je běžným jevem, tvorba semen je však velmi vzácná a vyžaduje umělého zásahu.

Původ

Česnek kuchyňský se pravděpodobně vyvinul z planého česneku *Allium longicuspis*. Pravlastí je Džungarsko (Severní Čína) ve Střední Asii, kde i dnes roste v přirozených podmínkách ve vyšších nadmořských výškách nad 500m. Dále se divoký česnek vyskytuje v Kavkazské oblasti a ve Středozeří. (ETOH A SIMON, 2002)

Výskyt v České republice je doložen podle archeologických nálezů již v pravěku. Roku 1946 byl v Kyjově na Moravě nalezen archeologický nálezy nádoby s větším množstvím česneku s natí, který je datován do pozdní doby kamenné (tzv. baarbelské kultury), tj. do období před 5000 let. V této době se rostliny česneku pravděpodobně nepěstovaly, pouze se sbíraly. Nálezy podobných rostlin pochází také z jeskyně Býčí skála na Moravě ze starší doby železné. (PETŘÍKOVÁ A KOL., 2006)

Ve starověkém Řecku a Římě byl pěstován nejen česnek kuchyňský (*Allium sativum*), ale i česnek ořešec (*Allium scordoprasum*) a česnek hadí (*Allium ophioscordon*).

Agrotechnika

Česnek kuchyňský se pěstuje výhradně výsadbou stroužků či pacibulek, tj. vegetativně, protože formy pěstované v ČR netvoří semeno. Sází se z větších stroužků, které se z cibule oddělují maximálně týden před výsadbou. Stroužky je vhodné namořit proti houbovým chorobám a hádátkům, také je vhodné je před výsadbou skladovat v chladničce při teplotě 5°C. Podzimní výsadba se provádí koncem října a začátkem listopadu do hloubky 5-8cm. Tato výsadba je vhodnější než jarní, neboť rostliny vysazené na jaře později raší a bývají častěji napadány patogeny. (MALÝ A PETŘÍKOVÁ, 2012)

Česneku kuchyňskému nejlépe vyhovují půdy hlinité a hlinitopísčité s dostatečnou zásobou živin. Optimální hodnota pH je 6,5-7,2. Česnek patří mezi plodiny II. a III. trati hnojení organickými hnojivy. (PETŘÍKOVÁ A KOL., 2012)

Sklizeň a skladování česneku

Cibule česneku roste nejvíce poslední tři týdny před sklizní. Sklízí se v době, kdy je obsah sušiny v cibuli 33-39% (PETŘÍKOVÁ A KOL., 2012). Vhodný termín je v době, kdy se nať začíná ohýbat, žloutne a zasychá. Sklízí se vyoraním pomocí záhonových podrývacích radlic. Česnek není vhodné vytahovat tahem za suknice, neboť cibule zůstává v zemi. Průměrný výnos je 6tun/1ha. Vyoraný česnek se ručně třídí a čistí. Optimální teplota pro skladování je 0-5°C, kdy dochází ke ztrátám na hmotnosti v objemu 10-15%. (MALÝ, 2013).

Za účelem uchování genofondu česneku lze efektivně využít kryoprezervace. Kryoprezervace rostlin funguje na principu uchovávání v kapalném dusíku při teplotě -196°C. Buňky je přitom nutné chránit proti ukládání krystalků ledu a zvyšováním koncentrace buněčného roztoku. Proto se při přípravě na zmrazení přidávají kryoprezervační látky – sacharóza, manitol, sorbitol, dimethylsulfoxid, glycerol a další. Pro kryoprezervaci jsou vhodnější buňky bez silné buněčné stěny s hustou cytoplazmou. Snížení teploty může proběhnout šokově ponořením do kapalného dusíku, nebo postupným ochlazením (HRADILÍK, 2005). Touto metodou je možné udržovat rostlinný materiál po řadu let bez poškození genetické informace a za minimálních

nákladů. Genofond Českého česneku je uchováván ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

Sortotypy česneku dle Malého (2003)

Paličáky: Modré zimní česneky, barva cibule je fialová, výnosově průměrné, skladovatelnost průměrná až podprůměrná. Mají pevný tvrdý krček, po jehož vylomení se cibule rozpadne na stroužky.

Nepaličáky širokolisté: Charakteristické tvorbou velkých cibulí, špinavě bíle zbarvených, někdy nafialovělých. Mají měkký krček, dobrou skladovatelnost, nadprůměrný výnos. Vysazují se na podzim.

Nepaličáky úzkolisté: Mají úzké ploché listy a tenké, výrazně srpkovité prohnuté stroužky. Skladovatelnost je nadprůměrná, výnos průměrný až podprůměrný. Vysazuje se na jaře.

Třídění česneku na typy H, A a U

Pro pěstování česneku v našich podmínkách mají význam tři typy – H, A a U. Toto třídění bere ohled na tvorbu lodyhy, stavbu cibule a vnitřní rytmus rostliny.

Varieta *Sagittata* – typ H, paličák.

Varieta *Vulgare* - typ U, širokolistý nepaličák.

Varieta *Variabilis* – typ A, úzkolistý nepaličák, dobrá skladovatelnost (KONVIČKA, 2010).

Odrůdy česneku

Dle Státní odrůdové knihy je k 15.6. 2014 v České republice uznáno celkem 18 odrůd česneku, z toho 3 odrůdy jarní a 15 odrůd ozimých.

Choroby a škůdci česneku

Mezi poškození abiotického původu patří zasychání špiček listů, sluneční úžeh a genetická porucha česneku.

Z řad chorob biotického původu napadá česnek například fusariová hniloba (*Fusarium oxysporum*), modrá hniloba (*Penicillium*), rzivost cibule (*Puccinia alli*), bílá hniloba cibule (*Sclerotium cepivorum*), svazovitost česneku (*Helmithoporum alli*), plíseň cibule (*Perenospora destructor*) a fytoplazmová žloutenka aster (Aster yellows phytoplasma).

Ze škůdců napadá česnek háďátko zhoubné (*Dityenchus dipsaci*), houbomilka česneková (*Suillia univittata*), vrtalka pórová (*Phytomyza hymnostoma*), třásněnka západní (*Trys tabaci*), květilka cibulová (*Delia antiqua*), vlnovník česnekový (*Aceria tulipae*), molík česnekový (*Acrolepia assectella*), larvy kovaříků - drátovci (*Elateridae*) (ROD.,2005).

Česnek kuchyňský napadá řada virů. Z nejzávažnějších zástupců patří patogeny z rodu *Potyvirus*, a to virus žluté zakrslosti cibule *Onion yellow harf virus* (OYDV) a virus žluté proužkovitosti póru *Leek yellow strike virus* (LYSV) Z rodu *Carlavirus* jsou to *Garlic common latent virus* (GarCLV), latentní vir šalotky *Shallot latent virus* (SLV), z čeledi *Reoviridae* *Garlic dwarf reovirus* (GDV).

Obsahové látky

Česnek obsahuje až 65-79 % vodu a sušinu. Sušinu tvoří vláknina, fruktóza, volné aminokyseliny a sloučeniny síry. Dále obsahuje saponiny, draslík, fosfor, zinek, selen a jiné. Je bohatý na vitamíny, zejména ze skupiny B. Obsah síry kolísá mezi jednotlivými odrůdami až v řádu 1000% (KONVIČKA., 2010).

Situace pěstování česneku kuchyňského v ČR

Sklizňová plocha česneku v roce 2013 byla 181 ha, vyprodukovalo se 1792 tun s průměrným hektarovým výnosem 4,85 tun na hektar. Roční spotřeba jednoho obyvatel pro rok 2013 je 0,9 kg (SITUAČNÍ A VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA ZELENINA., 12/2014).

Dovozní licence

Dovoz česneku do EU ze třetích zemí podléhá povinnosti předložení dovozní licence (NK (ES) čr. 341/2007). Dovozece musí zažádat o vývozní licenci ve státě, ve kterém má sídlo a je registrován jako plátce DPH (Situační a výhledová zpráva 2014). V případě běžného dovozu je nutné uhradit poplatek 50 eur/t, v případě celních kvót poplatek 60 eur/t. V roce 2013 bylo vydáno povolení pro dovoz 6485 tun česneku.

3.4. Kultivace česneku kuchyňského v podmínkách *in vitro*

Kultivace rostlin metodou *in vitro* probíhá v aseptickém kontrolovaném prostředí na živných půdách v nádobách (*in vitro* = ve skle).

Multiplikace – klonové množení rostlin *in vitro* je charakteristické velkým množitelským koeficientem, z malého množství materiálu lze vypěstovat velké množství samostatných rostlin, fenotypově i genotypově uniformních s mateční rostlinou. To je dáno totipotencí rostlinné buňky – schopnosti exprese celé genetické informace nutné k růstu a vývoji buňky. Pro multiplikaci rostlin *in vitro* je možné použít i ty části rostlin, které by se pro klasické vegetativní množení nedaly použít. Multiplikace *in vitro* má využití nejen ve výzkumu, ale i v komerční produkci.

Nevýhodou multiplikace je vysoká cena laboratorního zařízení, nutnost vyškoleného personálu a u mnoha rostlin chybějící informace o složení kultivačních médií a metodách kultivace.

In vitro kultury jsou cenné pro výzkum, ozdravování rostlin od virových onemocnění, pro vznik haploidních rostlin z haploidních buněk, tvorbu mutantů či polyploidů, mezidruhových hybridů vzniklých fúzí protoplastů, vznik geneticky modifikovaných hybridů, k indukci a sledování mutací, případně mohou být využity pro tvorbu sekundárních metabolitů v bioreaktorech.

U kulturních rostlin se metody multiplikace využívá i u druhů rozmnožujících se vegetativně z důvodu uchování genetické i fenotypové uniformity. Jedná se zejména o hybridy na vysoké úrovni heterozygotnosti podmiňující charakter kultivaru. (NOVÁK, 1990).

3.4.1 Historie kultivace rostlin *in vitro*

Za počátky *in vitro* kultur lze považovat pokusy KLEBSE (1887), který izoloval buňky řas a studoval jejich životní projevy. Roku 1887 formuloval hypotézu, že stejným způsobem by se daly kultivovat i buňky vyšších rostlin.

RECHINGER (1893) uveřejnil první výsledky o kultivaci rostlinných částí na živném médiu.

HABERLANDT (1902) se zabýval pokusy, které měly dokázat, že ke kultivaci rostlin lze použít i jednu jedinou buňku, a nezáleží tedy na velikosti rostlinného fragmentu.

Do roku 1934 se rostlinné explantáty nedařilo udržet v kultuře dlouhodobě. Teprve v tomto roce se WHILEMU (1934) podařilo za použití kvasničného extraktu udržet po dobu 7 let kulturu z kořenových špiček rajčete.

V roce 1952 odvodil MOREL a MARTIN (1952) první viruprosté rostliny.

MURASHIGE a SKOOG (1962) vytvořili dlouhodobě nepoužívanější médium z rozboru obsahu mikroprvků a makroprvků rozbořením popelu rostliny tabáku.

3.4.2 Multiplikace česneku kuchyňského

Konvenční množení česneku

Česnek kuchyňský se v konvenčních (polních) podmínkách množí výhradně vegetativně výsadbou stroužků či pacibulek. Hlavním problémem vegetativního množení

je přenos chorob a virů sadbovým česnekem. V případě výsadby z pacibulek růst cibule do standardní velikosti trvá 2-4 roky. Obecně se dá říct, že paličáky a širokolisté nepaličáky se vysazují na podzim, úzkolisté nepaličáky se vysazují na podzim i na jaře. Při podzimní výsadbě dosahujeme většího výnosu (KONVIČKA., 1998).

Množení česneku in vitro

Důvodem množení česneku *in vitro* je namnožení ozdraveného česneku pro převod do nesterilních podmínek *in vivo*. Bylo vypracováno několik metod pro mutliplikaci česneku *in vitro*, mezi ně patří multiplikace pomocí somatické embryogeneze, meristémových kultur, kultur odvozených z kořenových špiček a kultur stonkových disků.

Fáze multiplikace

Multiplikaci lze rozdělit do pěti fází – fáze přípravná, multiplikační, prodlužování a aklimatizace a převod do nesterilních podmínek *in vivo*.

Přípravná fáze multiplikace

V přípravné fázi je nutné vybrat rostlinu, z které bude odebraný explantát, odebrání explantátu a založení aseptické kultury. Mělo by se jednat o rostlinu v dobrém zdravotním stavu, nepoškozenou a nenapadenou patogeny. Odebíranou část volíme podle druhu a kultivaru.

Je důležité správně zvolit roční dobu, ve které explantát odebíráme. Nejlépe reagují explantáty z aktivně rostoucích částí rostliny, ze zásobních částí rostlin je vhodné odebírat ve stavu dormance.

Explantát je nutné patřičně dezinfikovat. Pokud je materiál pro multiplikaci udržován v laboratoři ve sterilní kultuře, použijeme ho bez další dezinfekce. Povrchová dezinfekce materiálu není snadná. Je nutné zničit bakterie na povrchu materiálu a zároveň nepoškodit rostlinné pletivo. Nelze tedy použít teplo. K povrchové dezinfekci se používají roztoky s dezinfekčním účinkem. Je nutné vhodně volit dobu a koncentraci látky (HRADILÍK, 2005).

Při dezinfikování rostlinného materiálu je předpokládáno, že vnitřní pletiva jsou sterilní. Po povrchové dezinfekci jsou odebírána pletiva, která nebyla zasažena nesterilním prostředím. Kvůli tomu, že semena jsou odolnější, lze použít vyšší koncentraci nebo delší působení dezinfekční látky (HRADILÍK, 2005).

Sterilita prostředí, ve kterém je pracováno s explantátem, je zajištěna laminárním boxem (flow-box), ve kterém je zabezpečeno horizontální proudění několikrát filtrovaného sterilního vzduchu, čímž je zamezeno infekci. Pracovní plocha laminárního boxu musí být před započítím prací dezinfikována 95% ethanolem (HRADILÍK, 2005), je vhodné rovněž celou místnost sterilizovat zářením germicidní zářivkou.

Prodlužovací fáze

Cílem prodlužovací fáze je růst prýtu rostliny, někdy spojený se zakořeňováním.

Převod od podmínek in vivo

Převod rostlin ze sterilních podmínek *in vitro* do nesterilních podmínek *in vivo* je spojený s řadou komplikací. Rostliny navyklé na 100% vzdušnou vlhkost je nutné pomalu otužovat. Více o převodu do nesterilních podmínek je popsáno v kapitole Tvorba cibule a převod do nesterilních podmínek.

3.5. Typy multiplikace vhodné pro česnek kuchyňský

3.5.1 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je proces vegetativní propagace, kdy jedinec vzniká ze somatické diploidní buňky. Embryo vzniká z jiné buňky než zygoty. Při tomto způsobu mikropropagace je z pletiva nejprve odvozen embryogenní kalus tvořený skupinou malých, cytoplazmou bohatých buněk. Indukce embryogenního kalusu je vyvolána nejčastěji vysokou koncentrací auxinu, nejčastěji 2,4-D (HRADILÍK,2005). Embryogenní kalus se nejčastěji odvozuje z vegetativních orgánů, protoplastů a pletiv (PROCHÁZKA a kol., 2003). Mladá pletiva, ve kterých probíhá dělení rychleji, jsou pro somatickou embryogenezi vhodnější. U česneku jsou používána kořenové a listové explantáty (HAVRÁNEK,2005).

Fereol a kol.(2002) použil pro mikropropagaci vnitřní listy z bazální části stroužku, u kterých byla překonána dormance. Na listových explantátech byl vytvořen kalus, který sloužil pro somatickou embryogenezi. Produkce kalusu byla pozorována na mladých listech i na kořenech, ale listy jeví větší potenciál pro embryogenezi. Až 75 % procent vzniklých kalusů diferenciovalo v somatická embrya (FEREOL A KOL., 2002).

Somatická embryogeneze je velmi účinná metoda multiplikace, bohužel však není vhodná pro množení ozdravených genotypů, neboť je vysoké riziko somaklonární variability (KŘIŽAN a kol., 2010, MARTIN,1998).

3.5.2 Multiplikace pomocí mechanického dělení

Mechanickým dělením se rozumí půlení či čtvrcení rostlin kultivovaných v podmínkách *in vitro*. Kultivovaná část je zkrácena na 2cm a jsou odstraněny kořeny. Ze spodní strany podpučí jsou cca 2mm hlubokým řezem rostliny nařezány na poloviny, respektive čtvrtiny. Všechny části drží v celku u sebe a rostlina je dále kultivována ve zkumavce s médiem (KŘIŽAN A KOL, 2010). Reakce genotypu bývá různá, v optimálních podmínkách dojde k vytvoření 4 rostlin, často však dochází k úplnému odumření explantátu. Množitelský koeficient dosahuje v průměru 1:1,15 (KŘIŽAN A KOL., 2010), praktický význam je jen u problematicky množitelných genotypů.

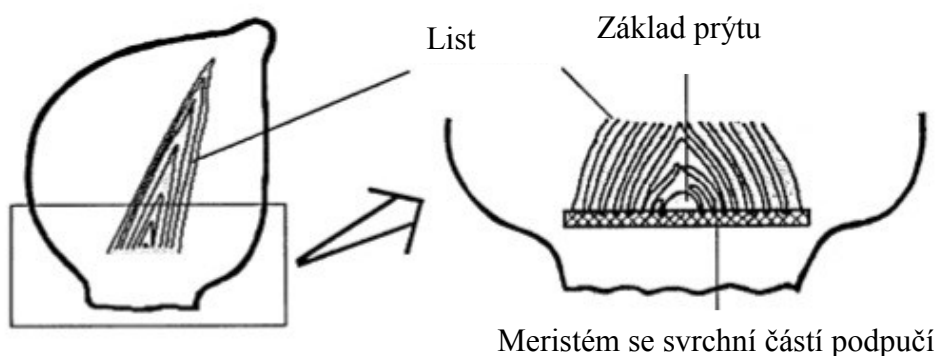
Pro multiplikaci pomocí mechanického dělení bylo použito MS médium (MURASHIGE, SKOOG, 1962).

3.5.3 Kultury z kořenových špiček

Metoda multiplikace česneku kuchyňského z kořenových špiček je neefektivnější metoda produkce cibulek. Je možné získat až 295 cibulek z jednoho stroužku (HAQUE A KOL.,2000). Jako primární explantát jsou používány 2-3mm dlouhé špičky kořenů, které byly nejprve kultivovány 15 dní na směsi destilované vody s 0,7% agaru (KŘÍŽAN A KOL, 2010). Kořeny byly po odebrání kultivovány na MS médiu (MURASHIGE, SKOOG,1962) s růstovými regulátory 2,2 mg.l⁻¹ BA a 0,2 mg.l⁻¹ NAA (KŘÍŽAN A KOL.,2010). V závislosti na odrůdě bylo procento vytvořených cibulek u explantátů v rozmezí 7,9-95,2 % (HAQUE A KOL.,2000). Cibulky byly tvořeny u všech odrůd, značně rozdílná byla jejich velikost. Ke kultivaci bylo použito několik odrůd, která se nejlépe jevila u odrůdy „White ropen“, která byla následně převedena do podmínek *in vivo*.

3.5.4 Kultury stonkových disků

„Stem-disc dome culture“ – metoda stonkových disků, která byla vyvinuta dle Ayabe a Sumiho (1998). „Stem-disc dome“ je cca 2mm velká část meristému se svrchní částí podpučí. Pro tento typ multiplikace bylo použito LS médium (LINSMAIER,SKOOG.,1965) a vyrůstalo na něm 20-30 výhonů



Obrázek 1.: Schéma uložení meristému s podpučím („Stem-disc dome“) (AYABE,SUMI.,1998).

(AYABE,SUMI.,1998). Množitelský koeficient stonkových disků je vysoký, více než 90% vzniklých výhonů formovalo cibulky.

3.5.5 Meristemové kultury

Kultury vzniklé izolací apikálního meristému jsou dobře popsány v práci KŘIŽANA A KOL. (2010). Kulturu je nutné založit převedením celého stroužku česneku do sterilních podmínek. Ze stroužku odstraníme zaschlé listy a povrchově jej dezinfikujeme pomocí 0,2% chloridu rtuťnatého. Doba dezinfekce je 17 min (KŘIŽAN A KOL., 2010). Poté následuje umístění stroužku do kádinky se sterilní vodou na 10 min, toto 3x opakujeme.

Stroužky ukládáme na médium R25 (MS bez růstových regulátorů s 25mg.l⁻¹ ribavirinu) zanořené do 1/3 velikosti. Teplotu kultivace je nutné udržovat v rozmezí 22-24°C, světelný režim 18 hodin světla/6 hodin tmy. Kultury vytvoří velké množství kořenů. Při velikosti nadzemní části cca 10 cm vyjmeme rostliny ze zkumavky a pod binokulární lupou sterilně odebereme meristém tak, že dvěma podélnými řezy mimo osu pochev obnažíme růstový vrchol a z něj pak vypreparujeme meristém velikosti 0,3 – 0,8 mm (KŘIŽANA KOL.,2010). Meristémy dále kultivujeme v celé rostliny ve shodných podmínkách jako stroužky na médiu C1 s přidavkem růstových regulátorů (MS s 0,5 mg.l⁻¹ BAP, 0,1 mg.l⁻¹ NAA a 0,5 mg.l⁻¹ GA3), případně je možná kultivace na tekutém médiu stejného složení bez agaru, kdy meristém uložíme na sterilní filtrační papír, který je ponořen v médiu (HAVRÁNEK, 2009). Každé 3 týdny jsou rostliny pastovány na čerstvé médium. Při pasážování jsou rostliny zkracovány na cca 3cm, čímž je udržujeme v růstu. Rostliny, které jsou multiplikujeme, nerozdělujeme skalpelem, ale kultivujeme je tak dlouho, dokud nedojde k jejich samovolnému oddělení.

Multiplikace česneku prostřednictvím izolace apikálního meristému je popsáno v řadě dalších prací: HAVRÁNEK (1972), UCMAN A KOL.(1998), AYBE a SUMI (2001).

3.6 Studium složení kultivačních médií pro multiplikaci česneku kuchyňského

Živná média (kultivační půdy) jsou základním faktorem pro úspěšnou kultivaci. Zajišťují nejen výživu explantátu, ale také ovlivňují jeho růst a vývoj pomocí růstových regulátorů a dalších látek.

Jsou složena z různých komponentů, patří mezi ně mikroelementy a makroelementy, cukry, růstové regulátory a vitamíny. Někdy se přidávají do média různé organické složky, které se z chemického hlediska nedají přesně definovat, jako například kokosové mléko nebo rajčatová šťáva. Dále se do média přidávají antioxidanty a aktivní uhlí. Mikroelementy, makroelementy a vitamíny mohou být připraveny ve formě zásobních roztoků. Médium je ředěno destilovanou nebo demineralizovanou vodou. S výjimkou tekutých médií bývá přidána ztužující látka, nejčastěji agar.(NOVÁK, 1990).

Nejčastěji používaným médiem je MS medium (Murashige a Skoog 1962).

Mezi další často používaná média patří LS (Linsmaier a Skoog 1962), B5 (Gamborea *et. al.* 1968) a WPM (Lloyd a McCown 1980). (HRADILÍK, 2005).

3.6.1 Makroelementy

Řadíme mezi ně šest nejdůležitějších prvků – dusík (N), fosfor (P), draslík (K), vápník (Ca), hořčík (Mg) a síru (S). Optimální koncentrace těchto prvků závisí na podmínkách explantace i na druhu rostliny.

Kultivační médium by mělo obsahovat 25-60 mM anorganického dusíku. (HRADILÍK., 2005). Explantáty lépe vstřebávají nitratový dusík, ale pro lepší růst je vhodné ho kombinovat s dusíkem ve formě amoniakálních solí. Nitratový dusík se do média přidává v koncentraci 25-40mM, amoniakální dusík v koncentraci 2-20mM. Dalším zdrojem dusíku jsou bílkovinné hydrolyzáty (hydrolyzát kaseinu, N-Z amin) v koncentracích 0,05-0,1%, nebo jednotlivé aminokyseliny, např. glycin, L-glutamin, L-asparagin v koncentracích do 100mg.l⁻¹. Aminokyseliny v živném roztoku mohou simulovat růst explantátů, přidávají se do buněčných suspenzí a protoplastových kultur.

Draslík se přidává ve formě chloridu či dusičnanu v koncentraci 20-30 mM. Optimální koncentrace hořčíku, fosforu, síry a vápníku se pohybuje v rozmezí 1-3 mM.(HRADILÍK, 1990)

3.6.2 Mikroelementy

Mezi mikroelementy řadíme mangan (Mg), zinek (Zn), bór (Br), měď (Cu), kobalt (Cb), molybden (Mo) a železo (Fe). Tyto prvky přidáváme v koncentracích 0,1 uM do 100 uM.

3.6.3 Cukry

Cukry slouží při kultivaci rostlinných explantátů jako zdroj uhlíku a energie. Nejčastěji se používá sacharóza, ve vzácných případech fruktóza nebo glukóza. Koncentrace sacharózy se obvykle pohybuje mezi 2-3%. Sacharóza představuje substrát heterotrofní výživy, působí jako osmoticky aktivní látka a zároveň je vhodným substrátem pro růst mikroorganismů v případě nedostatečné sterilizace.

Při sterilizaci v autoklávu se díky vysoké teplotě a tlaku sacharóza částečně rozpadá na glukózu a fruktózu.

3.6.4 Vitamíny

Rostliny si v přirozených podmínkách veškeré vitamíny syntetizují samy. V podmínkách explantace může být tato funkce narušená, snižena či úplně zastavena. Tím může dojít k hypovitaminóze, a tím pádem ke zpomalení až zastavení růstu. Proto mohou být vitamíny pro růst limitujícím faktorem.

Do médií se nejčastěji přidávají tyto vitamíny (HRADILÍK.,2005)

thiamin 0,1-10,0mg.l⁻¹

kyselina nikotinová 0,1-5,0 mg⁻¹

pyridoxin 0,1-10 mg⁻¹

myo-inositol 50-5000 mg.l⁻¹

V malých dávkách se přidává i kyselina askorbová (působí zároveň jako antioxidant), kyselina pantotenová, kyselina listotvá, biotin a riboflavin.

3.6.5 Nedefinované složky

V minulosti, kdy ještě nebylo dobře prozkoumáno působení rostlinných hormonů, byly do kultivačních médií s úspěchem často přidávány organické složky, z chemického

hlediska špatně definovatelné. Tyto látky částečně nahrazovaly rostlinné fytohormony. Některé z těchto látek se používají dodnes v případech, kdy explantát na přesně definované půdě roste obtížně, nebo neroste vůbec. Mezi nedefinované látky patří například bílkovinné hydrolyzáty (např. hydrolyzát kaseinu v koncentraci 0,1%), kvasničné extrakty, sladový extrakt, kokosové mléko (tekutý endosperm kokosové palmy v koncentraci 5-20%), extrakt z banánů, rajčatová nebo pomerančová šťáva, dřevní výluhy nebo mízní tekutina.

3.6.6 Růstové regulátory

Počáteční neúspěchy s kultivací rostlin v podmínkách *in vitro* měly zejména příčinu v nedostatečném prozkoumání a pochopení úlohy fytohormonů. Náhrada fytohormonů různými organickými látkami (kokosové mléko, rajčatová šťáva) měla jen částečný účinek.

Současná úroveň poznání úlohy fytohormonů v růstu, vývoji a integritě rostliny umožňuje jejich využití v oblasti explantátů do té míry, že jsou ve většině případů nedílnou složkou kultivačních médií, ať už se jedná o auxiny, cytokininy, gibbereliny či rostlinné inhibitory.

3.6.7 Auxiny

Auxiny jsou používány zejména k indukci tvorby kalusu a buněk, tvorbě adventivních kořenů, indukci somatické embryogeneze a ke stimulaci růstu apikálních meristémů. Obvyklé množství auxinů v médiu je 0,1-20mg.l⁻¹ (HRADILÍK., 2005).

Nejčastěji jsou pro rostlinné explantáty využívány tyto auxiny:

kyselina indolyl-3-octová (IAA)

kyselina indolyl-3-máselná (IBA)

kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA)

kyselina 2,4-dychlorfenoxyoctová (2,4-D)

kyselina naftyloctová (NAA)

kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T)

kyselina 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová (dicamba)

kyselina 4-amino3,5,6-trichlorpikolinová (picloram)

Účinnost jednotlivých auxinů je různá. Závísí na typu explantátu a kultivačních podmínkách. Je uváděno, že 2,4-D je 8-12x účinnější než IAA, 2,4,5-T je účinnější než IAA, NAA je 2x účinnější než IAA. (HRADILÍK., 2005).

3.6.8 Cytokininy

Úloha cytokininů v rostlinném metabolismu je podpora buněčného dělení, aktivace meristémů a tvorba pupenů, snižují apikální dominanci a podporují větvení (podpora růstu axilárních pupenů). Cytokininy často brání růstu kořenů v důsledku inhibice zakládání adventivních kořenů. Účinnost cytokininů se zvyšuje přidáním adeninu. Do kultivačních médií se nejčastěji přidávají tyto cytokininy (HRADILÍK., 2005):

benzylaminopurin (BAP)

isopentiladenin(2iP) -/N (3-methyl-2-butenyl)-1H-purin-6-amine/

furfurylaminopurin (kinetin)

zeatin

3.6.9 Gibereliny

Přídavek giberelinů do média obvykle není vyžadován. V některých případech přídavek giberelinů stimuluje růst explantátu či ruší endogenní dormanci. Z dostupných giberelinů se nejčastěji používá GA₃ pro stimulaci růstu buněčných kultur, stimulaci růstkalusu a zakrslých rostlin. Při užití giberelinů je nutné současné přidání auxinů, bez toho se účinek giberelinů neprojeví. Dalším, méně často používaným giberelinem je GA₇.

3.6.10 Inhibitory růstu

Kyselina abcisová se do médií přidává výjimečně pro indukci tvorby somatických embryí, stimulaci tuberizace, zbrzdění růstu explantátu nebo k navození dormance.

Z dalších inhibitorů růstu je možné použít syntetický preparát CCC (chlorcholinchlorid), kyselinu 2,3,5-trijodbenzoovou, hydrazin kyseliny maleninové či další inhibitory využívané v experimentální morfologii.

3.6.11 Aktivní uhlí

Aktivní uhlí většinou při přidání do kultivačního média ovlivňuje pozitivně růst explantátu a prodlužuje termín mezi jednotlivým pasážováním. Aktivní uhlí má díky svému specifickému velkému povrchu schopnost vázat na sebe toxické látky produkované explantátem (např. fenolové sloučeniny, chinony). Současně na sebe uhlí váže fytohormony do média přidané i produkované explantátem. Optimální dávka aktivního uhlí je 0,5-3,0%.

3.6.12 pH média

pH média je určeno koncentrací vodíkových iontů. Ovlivňuje metabolismus rostliny a příjem živin rostlinou. Během autoklávování se pH média mění (NOVÁK, 1990). pH živného média pro kultivaci česneku je upraveno na hodnotu 5,8-6,0. Změna na zásaditou stranu se provádí přidavkem hydroxidu sodného, na kyselou stranu přidavkem kyseliny chlorovodíkové.

3.6.13 Voda

Pro přípravu živných médií se používá destilovaná nebo demineralizovaná voda.

3.6.14 Zpevnění média

Pro kultivaci rostlinných explantátů jsou nejčastěji používána tuhá média. Dokonale rozpuštěné minerální a organické složky je zapotřebí převést na pevné médium přidáním agaru. Zpevnění média je nutné k tomu, aby rostlina zůstala na povrchu a měla kontakt se vzduchem.

Agar je získáván z mořských řas a je na trh dodáván v různé kvalitě a čistotě. Tuhost média je možné regulovat množstvím přidaného agaru (0,8-1%), pH média a druhem agaru.

Za normálních podmínek agar tuhne při teplotách pod 45°C, takže při obvyklých teplotách je gel stabilní. Pokud je při sterilizaci média překročena teplota 121°C nebo bylo-li médium sterilizováno opakovaně, agar ztrácí schopnost tvořit gel.

Vedle agaru je možné použít řadu dalších látek, jako Phytigel a Gerlite v koncentracích 1,25-2,50 g/l. (HRADILÍK, 2005).

3.7 Příprava kultivačních médií

Kultivační média se připravují z destilované vody a chemikálií o minimální čistotě p.a. (HRADILÍK,1992). Čistota sacharózy prodávané v obchodech je pro přípravu médií dostatečná. V praxi se kultivační médium připravuje ze zásobních roztoků pipetováním. Zásobní koncentrované roztoky si můžeme připravit sami nebo můžeme použít komerčně vyráběné produkty.

3.7.1 Růstové regulátory

Kyselina indolyl-3-octová (IAA) je nestabilní, a zásobní roztoky ani v lednici nevydrží déle než jeden týden. Auxiny NAA a 2,4-D vydrží v lednici až 8 měsíců (HRADÍLEK,2005).

Špatně rozpustné fytohormony se nejprve rozpustí v malém množství 95% etylakoholu a po rozpuštění se doplní destilovanou vodou na potřebný objem. NAA se rozpustí v malém množství 1M KOH nebo NaOH. V tomto případě je nutné počítat se změnou pH a po doplnění baňky nutné upravit na pH 5,5-5,8 (HRADÍLEK,2005).

Cytokininy jsou v roztoku poměrně stabilní a vydrží v lednici několik měsíců. Navážka cytokininů se rozpustí v malé množství 1M NaOH nebo HCl. Pro lepší rozpuštění si můžeme pomoci zahřátím baňky nad kahanem k bodu varu.

Pro přípravu kultivačního média je důležité dodržet správnou hodnotu pH média udanou autory média. Hodnota pH bývá obvykle 5,5-6,0. Této hodnoty dosáhneme úpravou 1M KOH nebo HCl.

3.7.2 Sterilita

Sterilita je základním kamenem úspěchu kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*. Sterilní musí být nejen nádoby s kultivačním médiem, ale také veškeré nástroje, které jsou pro odvození kultury a mikropropagaci užity, povrch rostliny i prostředí, ve kterém se s explantátem pracuje.

Sklo a nástroje se nejprve umyjí v teplé vodě za pomoci saponátu s detergentním účinkem, poté se opláchnou vodovodní vodou a následně vodou destilovanou. Poté

je nutné provést sterilizaci v horkovzdušném sterilizátoru nebo autoklávu. Během práce ve flow-boxu se nástroje sterilizují ponořením do nádoby s 95% ethanolem a následným vyžiháním v plamenu kahanu.

Média se sterilizují v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15-40 min nebo filtrací přes bakteriální filtr (NOVÁK,1990). Sklo s médiem musí být uzavřeno víčkem, nejčastěji

se používají hliníkové fólie nebo kovové šroubovací víčko se zátkou z molitanu, která umožňuje výměnu plynů. Pro sterilizaci v autoklávu je nutné zvolit správnou délku sterilizace podle objemu média (HRADILÍK,2005).

Ne všechny komponenty médií jsou termostabilní a při vysokém tlaku a teplotě nedegradují. Maximální tlak při autoklavování se nastavuje na 141kPa, při vyšším tlaku a teplotě se poškozuje i relativně stabilní složky (NOVÁK,1990). Mezi termolabilní složky řadíme vitamíny, aminokyseliny, bílkoviny a gibereliny. Tyto složky je nutné sterilizovat filtrací. Pro dosažení sterility se používají filtry s velikostí ok menší než 0,2 µm (NOVÁK, 1990) Přefiltrované komponenty média se do zbytku média sterilizovaného v autoklávu přidávají až po vychladnutí.

3.7.3 Znehodnocení založené kultury

Při nedostatečné sterilizaci nebo kontaminaci média během práce dochází k mikrobiální kontaminaci (FELNER,1996). Ta se většinou projeví do 3 dnů od založení kultury. Takto kontaminované rostliny je nutné zlikvidovat, případně pokud je kontaminací zasažena jen část média, je možné přenést explantát na nové médium.

Často dochází ke hnědnutí nebo černání explantátu, které je způsobeno poškozením během dezinfekce explantátu nebo hromaděním fenolických látek. Pro zabránění hromaděním fenolických látek je vhodné přidat do média antioxidant (kys. L-askorbovou), snížit nebo zastavit aktivitu fenoláz nebo odstranit fenolickélátky z média. Je možné přidat do média aktivní uhlí nebo polyvinylpyrrolidon k absorpci těchto látek (HRADILÍK,2005). Pomocí častého pasážování rostlin na nové médium zabráníme ukládání fenolických látek a hnědnutí média. Tento proces provádíme obvykle jednou za 4-5 týdnů, můžeme i častěji.

3.8 Další faktory ovlivňující růst kultury

3.8.1 Teplo

Optimální teplota pro explantátové kultury je 20-25°C. Pro zvýšení vitality a omezení infekce je vhodné po založení explantátu udržovat teplotu nižší. Pro kultivaci česneku udržujeme v místnosti teplotu 23°C (KŘÍŽANA KOL., 2015).

3.8.2 Světlo

Pro organogenezi je důležité spektrum světla a jeho intenzita. Při nedostatku nebo naopak nadbytku světla mohou explantáty nekrotizovat. Dalším faktorem je možnost ovlivňování fotoperiody. Při kultivaci česneku kuchyňského se v místnosti udržuje fotoperioda 16 hodin světlo/8 hodin tma (KŘÍŽANA KOL.,2010).

3.8.3 Prevence hyperhydricity

U některých rostlin dochází během kultivace k vodnatění pletiv, tzv. hyperhydrataci. To může být zapříčiněno vysokou vzdušnou vlhkostí, vlivem osmotických látek v médiu (sacharózy) či koncentrací agaru a fytohormonů. U rostlin se hyperhydratace projevuje špatným vývojem pletiv, sklovitým a nezdravým vzhledem, rostliny jsou světle zelené a postupně hnědnou. Průduchy napadených pletiv ztrácí funkci (NOVÁK,1990).

Hyperhydrataci můžeme částečně zabránit zvýšením poměru dusičnanu draselného

ku chloridu amonnému. Doporučuje se také chladit dna kutlivačnických nádob s médiem.

U lehce postižených rostlin odstraníme poškozenou část, rostlinu zakrátíme a dále kultivujeme (KŘÍŽANA KOL.,2010). Rostliny je vhodné častěji přemísťovat na nové médium. Většina rostlin dále projevuje normální vývoj, silně vodnaté jedince likvidujeme.

Rovněž je důležitá intenzita světla, s větší intenzitou světla bylo procento vodnatých rostlin nižší.

3.8.4 Tvorba cibule a převod rostlin do nesterilních podmínek

Pro převod česneku kuchyňského ze sterilního *in vitro* prostředí do nesterilního *in vivo* je nutné, aby rostlina vytvořila cibuli. Tvorba cibule je podmíněna zejména vysokou osmotickou aktivitou média, tj. vysokou koncentrací sacharózy. Rostliny určené pro převod kultivujeme na MS médium bez regulátorů růstu s 120g.l^{-1} sacharózy. Rostliny v tomto médiu vytvoří cibulku a následně zatáhnou. Cibulky po vyjmutí z média jsou uchovávány v lednici pro odbourání dormančních látek nebo je bezprostředně vysazujeme. Před výsadbou cibule namočíme do vody kvůli odstranění zbytků média a ošetřujeme postřikem 0,15% Previcuru. Úspěšnost převodu do nesterilních podmínek je značně ovlivněna použitím růstových regulátorů v prostředí *in vitro* (KŘÍŽANA KOL., 2010).

Výsadbu je vhodné naplánovat na jarní období, aby rostlina mohla využít celou vegetační dobu. Vysazené cibule je nutné krýt fólií z důvodu zabezpečení vysoké vzdušné vlhkosti. Teplota vzduchu nesmí překročit 38°C . Při převodu dochází k minimálnímu úhynu rostlin (cca 8%) (KŘÍŽAN A KOL, 2010). Sedmý den po převodu sejmem krycí fólii a třikrát za den provětráváme, čímž postupně navykáme rostliny na sníženou vzdušnou vlhkost. Intervaly každý den prodlužujeme. Po čtyřech týdnech rostliny v množárně ponecháme bez zakrytí. Rostliny pěstujeme do velikosti 12-15cm, poté je možné je přemístit do venkovních prostor. Rostliny každý třetí den po převodu ošetřujeme fungicidními látkami, a to přípravky Ridomil Gold Plus 42,5 WP (oxichlorid mědi, metaxyl-M) v koncentraci 0,1% a Carben Flo Stefes (carbendazim) v koncentraci 0,1%. Oba přípravky aplikujeme spolu se smáčedlem Silwed 77 (KŘÍŽAN A KOL., 2010).

3.9 Genetická nestabilita explantátových kultur

Buněčné a kalusové kultury jsou při dlouhodobé kultivaci geneticky málo stabilní. Nejčastěji dochází ke genomovým mutacím (polyploidie, aneuploidie), k tvorbě chimér či chromozomovým mutacím, které vedou k morfologickým a fyziologickým změnám. Pro klonové množení jsou tyto změny nežádoucí, jsou však velice žádané při šlechtění nových odrůd, zejména k rezistenci.

Vedle genetických změn dochází k in vitro kulturách ke změnám fenotypu způsobených eigenetickými a fyziologickými změnami. Mezi ně patří změna morfologie listů, zpomalení růstu a regenerace, barevné změny atd. (HRADILÍK, 2005).

4. Vlastní komentář k řešené problematice

Metoda multiplikace česneku kuchyňského je důležitou metodou předcházející ozdravení genofondu česneku od virových patogenů.

Častým problémem při kultivaci *in vitro* bývá mikrobiální kontaminace, která často zničí celou kulturu. Této možnosti se lze vyhnout důkladnou dezinfekcí materiálu, pěstováním z meristémových kultur, u kterých je povrchová - kontaminovaná část rostliny odstraněna, nebo přidáním antibiotika do média.

Jako nejčastější problém při kultivaci česneku se jeví hyperhydratace pletiv. Té lze částečně zabránit zvyšováním koncentrace dusičnanu draselného ku chloridu amonnému a dostatečnou světelnou intenzitou v kultivační místnosti.

Dalším problémem jsou různé nároky jednotlivých odrůdy česneku, především na složení média. Při vyzkoušení regulátorů růstu (IAA,NAA,KIN,BA,2-iP) se reakce genotypů značně liší.

Jako úspěšná se především ukázala různě modifikovaná MS média (MURASHIGE, SKOOG.,1962).

5. Závěr

První část bakalářské práce je zaměřena na popis rodu *Allium* Mill. Rod *Allium* řadíme do čeledi *Amaryllidaceae* – amarylkovité. Jedná se o rod vytrvalých jednoděložných bylin s podzemní cibulí jednoduchou nebo složenou, přizemními jednoduchými listy s listovými pochvami uspořádanými dvouřadě nebo spirálově. Květenstvím je obvykle lichookolík. Květy jsou jednodomé oboupohlavné. V květenství někdy bývají přítomny pacibulky. Okvětí bývá jednoduché volné, složené z 6 lístků, tyčinek je 6. Semeník je svrchní, plodem je tobolka. Rostliny jsou charakteristické svým aroma zapříčiněným sloučeninami se sirnými vazbami. V České republice se vyskytuje 16 druhů rodu *Allium*, mezi nejvýznamnější z nich patří česnek kuchyňský (*Allium sativum*), pór zahradní (*Allium porrum*), pažitka pobřežní (*Allium schoenoprasum*) a cibule kuchyňská (*Allium cepa*).

Druhá část této práce je zaměřena na popis česneku kuchyňského (*Allium sativum*). Česnek obsahuje až 79% vody. V sušině jsou obsaženy různé nutričně prospěšné a léčebné látky, např. sloučeniny obsahující síru (allicin, allinin) či vitamíny A, B₁, B₃, B₅ a C. Obsah těchto látek kolísá a závisí na původu, počasí, hnojení, odrůdě, atd. V České republice je registrováno k 15. 6. 2014 18 odrůd česneku, z toho 3 odrůdy jarní a 15 odrůd ozimých.

V další části této práce jsou shrnuty metody použité s větším či menším úspěchem pro multiplikaci česneku kuchyňského *in vitro*. Patří mezi ně multiplikace z apikálního meristému, dělení mechanickými zásahy, metoda stonkových disků – tzv. „sten-disc dome culture“, multiplikace formou somatické embryogeneze a multiplikace z kořenových špiček. Nejčastějším problémem bývají jednotlivé specifické odrůdové nároky na médium. Z dalších problémů můžeme vyjmenovat například problémy s mikrobiální kontaminací či s hyperhydratací pletiv.

V poslední části jsou rozepsány jednotlivé komponenty kultivačních médií včetně jejich přípravy. Jako úspěšné se především ukázaly různé modifikace MS média (MURASHIGE, T. SKOOG, F. 1962), např. C5 média (MS médium bez regulátorů růstu s 120g.l⁻¹ sacharózy) nebo C1 (MS s 0,5 mg.l⁻¹ BAP, 0,1 mg.l⁻¹ NAA a 0,5 mg.l⁻¹ GA3). Dále jsou popsány metody kryoprezervace, vliv dalších faktorů při kultivaci *in vitro*, metody prevence hyperhydratace, vznik genomových mutací u kalusových

a tkáňových kultur, tvorba cibule česneku v podmínkách *in vitro* a úzce jsem se zmínil o převodu česneku do nesterilních podmínek.

6. Souhrn

Název: Multiplikace česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.) v podmínkách *in vitro*

Souhrn: Tato práce je zaměřena na studium multiplikace česneku kuchyňského a složení kultivačních médií. Nejlépe propracovanou metodou multiplikace je izolace apikálního meristému. Bylo vyzkoušeno mnoho druhů médií. Z výsledků vyplývá, že každá odrůda česneku má jiné nároky na živiny a růstové regulátory. V této práci můžeme najít popisy úspěšných metod multiplikace česneku a popis kultivačních médií včetně reakcí česneku. Multiplikace rostlin *in vitro* představuje způsob množení, při kterém jsou ve sterilních podmínkách kultivovány dezinfikované části rostlin (explantáty) na živném médiu v kontrolovaných podmínkách za účelem získání celých nových rostlin či ozdravování rostlinného materiálu od patogenů. Tato metoda množení představuje metodu pro studium rostlin a stále častěji i metodu pro jejich komerční pěstování.

Klíčová slova: *Allium sativum*, *in vitro*, multiplikace, média

7. Summary

The title: *In vitro* multiplication of garlic (*Allium sativum* L.)

Abstract: This thesis is focused on study of *Allium sativum* multiplication and the composition of cultivation media. The best elaborated method is the multiplication of isolated apical meristem. Many different kinds of media have been tried, the results implies that each variety of garlic has different requirements for nutrients and growth regulators. In this work we can find descriptions of successful multiplication methods of and descriptions of used media, including the response of garlic to them. *In vitro* plant micropropagation represents a special way of propagation, when in controlled sterile conditions there are disinfected parts of plants (explants) cultivated on a nutrient medium to obtain a whole new plant or sanitation of plant material from pathogens. This method of propagation is used for study of plants and more often for commercial plant growing.

Key words: *Allium sativum*, *in vitro*, micropropagation, media

8. Seznam použité literatury a informačních zdrojů

"Česnek ve 21. století": sborník příspěvků ze semináře : Regionální centrum Olomouc 16.5.2012. 2012. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 75 s., 10 l. příl. ISBN 978-80-7427-102-1.

AYABE, M. a S. SUMI. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 17(10): 773-779. DOI: 10.1007/s002990050481.

BADRIA, F. A. a A. A. ALI. 1999. Chemical and Genetic Evaluation of Somaclonal Variants of Egyptian Garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Medicinal Food*. 2(2): 39-43. DOI: 10.1089/jmf.1999.2.39.

BARANDIARAN, X., N. MARTÍN, M. F. RODRÍGUEZ-CONDE, A. Di PIETRO a J. MARTÍN. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 18(5): 434-437. DOI: 10.1007/s002990050599.

ETOH, T. a P. W. SIMON. 2002. Diversity, fertility and seed production of garlic. *Allium crop science: recent advances*. Wallingford: CABI, : 101. DOI: 10.1079/9780851995106.0101. ISBN 9780851995106. Dostupné z: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20083015162>

FAOSTAT 2015 [online] [cit. 25. 04. 2015]. Dostupné z: <http://faostat3.fao.org/>

FELLNER, M., W. KNEIFEL, D. GREGORITS a FASSLER. 1996. Identification and antibiotic sensitivity of microbial contaminants from callus cultures of garlic *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Regei. *Plant Science*. 113(2): 193-199. DOI: 10.1007/978-94-015-8951-2_23.

FEREOL, L., V. CHOVELON, S. CAUSSE a R. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 21(3): 197-203. DOI: 10.1007/s00299-002-0498-0.

HACISEFEROĞULLARI, H., M. ÖZCAN, F. DEMİR a S. ÇALIŞIR. 2005. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Food Engineering*. 68(4): 463-469. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.06.024.

HAVRÁNEK, P. 1972. Viruprosté klony česneku kuchyňského získané z meristémových kultur. *Sborník ÚVTI – Ochrana rostlin*. (8): 291-298.

HAVRÁNEK, P. 2005. Systém produkce certifikované sadby česneku. *Redakčně upravená závěrečná správa grantového projektu Ministerstva zemědělství ČR*. (QE 1108).

KONVIČKA, O. 1998. *Česnek (Allium sativum L.): základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky*. Olomouc: vl.nákl., 167 s. ISBN 80-238-1928-3.

KOPEC, K. 1998. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Vyd. 1. Praha: ÚZPI, 72s. ISBN 80-861-5364-9.

KŘÍŽAN, B. 2010. *Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách in vitro: certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 28 s. ISBN 978-80-7375-490-7.

KŘÍŽAN, B. 2010. *Metodika ozdravování česneku od virů pomocí kultivace meristému a in vitro kultur: certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 24 s. ISBN 978-80-86940-30-4.

KUBÁT, K. a R. BĚLOHLÁVKOVÁ. 2002. *Klíč ke květeně České republiky*. Vyd. 1. Praha: Academia, 927 p. ISBN 80-200-0836-5.

LINSMAIER, E. M. a F. SKOOG. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 18(1): 100-127. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x.

MALÝ, I. a . 1998. *Polní zelinářství*. Praha: Agrospoj. ISBN 978-802-3942-323.

MALÝ, I. a K. PETŘÍKOVÁ. 2000. *Základy pěstování cibulové zeleniny*. Vyd. 1. V Praze: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 26 s. Rostlinná výroba. ISBN 80-710-5205-1.

MALÝ, Ivan. 2003. *Pěstujeme cibuli, česnek, hrách a další cibulové a luskové zeleniny*. 1. vyd. Praha: Grada, 83 s. ISBN 80-247-0635-0.

MURASHIGE, T. a F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

NAGAKUBO, T., A. NAGASAWA a H. OHKAWA. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32(2): 175-183. DOI: 10.1007/bf00029840.

NOVÁK, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 208 p. ISBN 80-200-0344-4.

PETŘÍKOVÁ, K. a J. HLUŠEK. 2012. *Zelenina: pěstování, výživa, ochrana a ekonomika*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 191 s. ISBN 978-80-86726-50-2.

REICHINGER, C. 1893. Untersuchungen uber die Grenzen der Teilbarkeit im Pflanzenreich. *Verhandl.zool.-bot.Ges. Wien*. (43): 310-334.

ROBERT, U., J. ŽEL a M. RAVNIKAR. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Scientia Horticulturae*. 73(4): 193-202. DOI: 10.1016/s0304-4238(98)00074-0.

ROD, Jaroslav. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy: ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany rostlin*. Brno: Biocont Laboratory, 392 s. ISBN 80-901-8743-9.

STAVĚLÍKOVÁ, H. 2008. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection - Information. *Hort. Sci.* 35(3).

WHITE, P. R. 1934. Potentialy unlimited growth of excised tomato root in liquid medium. *Plant Physiology*. 9(3): 585-600. DOI: 10.1104/pp.9.3.585.