

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

Zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Ing. Eva Ondrušíková, CSc.

Vypracovala:
Bc. Barbora Klementová

Lednice 2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Barbora Klementová**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Název tématu: **Zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách in vitro**
Rozsah práce: 50

Zásady pro vypracování:

1. Cílem práce je využít a rozšířit informace o složení kultivačních médií pro zakořeňování révy vinné v podmínkách in vitro.
2. Budou založeny primární kultury vybraných podnoží *Vitis vinifera*.
3. Bude posouzen vliv jednotlivých kultivačních médií s různou kombinací růstových regulátorů na zakořeňování v podmínkách in vitro.

Seznam odborné literatury:

1. ALIZADEH M., SINGH S. K., PATEL V. B. (2010): „Comparative performance of in vitro multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes.“ International Journal of Plant Production 4 (1): 41-50. 1735-6814.
2. DEV, R., SINGH, S., SINGH, A., VERMA, M. (2015): „Comparative in vitro multiplication of some grape (*Vitisvinifera*) genotypes“. INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES 85 (11). ISSN: 0019-5022
3. KŘIŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., MOUDRÁ, J. (2012): The effect of media composition on multiplication of grape root stocks in vitro. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LX, No. 8, pp. 141–144
4. MURASHIGE, T., SHABDE, M. N., HASEGAWA, P. M. (1972): J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 97: 158.

Datum zadání diplomové práce: únor 2016

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2017

L. S.

Bc. Barbora Klementová
Autorka práce

Ing. Eva Ondrušiková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí ústavu



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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci **Zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *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 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 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: 1.4 2017

.....
podpis

Poděkování:

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Evě Ondrušikové, CSc. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi při zpracování poskytla. Dále chci poděkovat všem, co mi poskytli rady ohledně úpravy diplomové práce.

OBSAH

1 Úvod.....	10
2 Cíl práce.....	11
3 Literární přehled	12
3.1 Botanická charakteristika révy vinné.....	12
3.1.1 Botanické zařazení révy vinné.....	12
3.1.2 Původ, klasifikace a rozšíření rodu <i>Vitis L.</i>	12
3.1.3 Podrod <i>Muscadinia</i>	12
3.1.4 Podrod <i>Euvinis</i>	13
3.2 Morfologie révy vinné	13
3.2.1 Kořenový systém révy vinné	14
3.3 Rozmnožování révy vinné	15
3.3.1 Generativní způsob rozmnožování	15
3.3.2 Vegetativní způsob rozmnožování.....	15
3.4 Kultivace révy vinné v podmínkách <i>in vitro</i>	16
3.4.1 Rostlinné explantáty a jejich historie.....	17
3.4.2 Techniky kultivace révy vinné v podmínkách <i>in vitro</i>	17
3.4.3 Metody sterilizace rostlinného materiálu.....	18
3.4.4 Metody sterilizace prostředí.....	19
3.4.5 Sterilizace v autoklávu.....	20
3.4.6 Kultivační média pro rostlinné explantáty.....	20
3.4.6.1 Voda.....	21
3.4.6.2 Agar	21
3.4.6.3 Vitamíny	22
3.4.6.4 Cukry	22
3.4.6.5 Makroelementy	23
3.4.6.6 Mikroelementy.....	24

3.4.6.7 Fytohormony.....	25
3.4.7 Zakořeňování v podmínkách in vitro.....	29
4 Metodika	30
4.1 Kultivační místnost a laboratoř.....	30
4.2 Podnožový materiál	30
4.2.1 Kober 5BB	30
4.2.2 Craciunel 2.....	31
4.2.3 Kober 125 AA.....	31
4.2.4 SO 4	32
4.3 Založení primární kultury	32
4.4 Zakořeňování Vitis vinifera v podmínkách in vitro.....	35
4.4.1 Příprava kultivačních médií.....	35
4.4.2 Založení pokusu	37
4.4.3 1.Měření.....	38
4.4.4 2.Měření.....	40
4.4.5 3.Měření.....	42
5 Výsledky a hodnocení.....	45
5.1 Médium C0	45
5.2 Médium C1	46
5.3 Médium C2	48
5.4 Médium C3	50
6 Diskuze	53
7 Závěr	55
8 Souhrn, resume a klíčová slova	57
9 použitá literatura	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1 Autokláv s připravenými médii k autoklávování	20
Obr.2 Jednodální segmenty na kultivačním médiu.....	33
Obr. 3 Jednodální segmenty podnože K5BB bez známek prorůstání úžlabních pupenů 20. den kultivace	34
Obr.4 Jednodální segment podnože CR2 s prorostlými úžlabními pupeny.....	34
Obr.5 Explantát po založení pokusu na médiu C3.....	37
Obr.6 Proliferace kořenů explantátu na médiu C1	38
Obr.7 Explantát na médiu C2 s výrazným růstem kořene s kořenovým vlášením	39
Obr.8 Explantát na médiu C0 s výrazným růstem kořene	40
Obr. 9 Explantát na médiu C1 s patrným růstem kořenů.....	41
Obr.10 Explantáty na médiu C2 s mohutným růstem kořenů.....	41
Obr.10 Explantáty na médiu C1, které nevytváří kořeny	42
Obr.11 Explantáty na médiu C1 s výrazným růstem kořenů	43
Obr. 12 Explantáty vyjmuté z média C0.....	45
Obr. 13 Explantáty vyjmuté z média C0.....	45
Obr. 14 Explantáty vyjmuté z média C0.....	46
Obr. 15 Explantáty vyjmuté z média C1.....	46
Obr. 16 Explantáty vyjmuté z média C1.....	47
Obr. 17 Explantáty vyjmuté z média C1.....	47
Obr. 18 Explantáty vyjmuté z média C2.....	48
Obr. 19 Explantát vyjmutý z média C2	49
Obr. 20 Explantáty vyjmuté z média C2.....	49
Obr. 21 Explantáty vyjmuté z média C3.....	50
Obr. 22 Explantáty vyjmuté z média C3.....	50
Obr. 23 Explantáty vyjmuté z média C3.....	51

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Průběh zakořeňování explantátů na jednotlivých médiích.....	44
Graf 2: Délka kořenů na rostlinu na jednotlivých médiích.....	52
Graf 3: Počet kořenů na rostlinu na jednotlivých médiích	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení kultivačního média Murashige and Skoog (Trigiano, 2000).....	35
---	----

1 ÚVOD

Pěstování révy vinné (latinským názvem *Vitis vinifera*) má v České republice dlouhou tradici, přičemž plochy vinic v České republice dosahují bezmála 18 000 ha. Naše republika se řadí mezi malé vinařské země. Obliba vína jeho spotřeba však neustále stoupá, což je předpoklad pro další rozvoj vinohradnictví. Jen v Evropě vinice pokrývají plochu přes 4 000 000 ha. Z globálního hlediska zaznamenala v posledním desetiletí největší rozmach výsadby vinic Čína, jejíž vinice zaujímají plochu přes 800 000 ha. Réva vinná se pěstuje především pro své plody, ze kterých se vyrábí alkoholovým kvašením víno, ale využívají se také pro přípravu moštů nebo jako sušené ovoce.

V souvislosti s růstem pěstování révy vinné, a tedy i poptávce po výsadbovém materiálu, zejména po podnožových odrůdách révy vinné, je stále více využíváno množení rostlinného materiálu v podmínkách *in vitro*. Tato metoda je využívána v experimentálním výzkumu a v mnoha šlechtitelských a množitelských podnicích. Nespornou výhodou této metody je produkce velkého množství rostlin, které lze vypěstovat na poměrně malém prostoru v porovnání s tradičními metodami vegetativního rozmnožování. Kultivace není závislá na ročním období a také rychlost množení je vyšší než u tradičních metod. Další výhodou je produkce bezvirózního materiálu.

Zakořeňování prýtů v podmínkách *in vitro* je poměrně pracné a tento proces zvyšuje celkové náklady na množení rostlin. Úspěšné zakořeňování je klíčové pro produkci životaschopných rostlin. Cílem je indukce adventivních kořenů a vytvoření kořenového systému, který dostatečně vyživí nově vytvořenou rostlinu. Pro zakořeňování v kulturách *in vitro* jsou široce využívány auxiny. Tyto rostlinné hormony ovlivňují samotnou rhizogenezi, indukci tvorby adventivních kořenů, funkčnost, délku a počet kořenů. Složení média a poměr regulátorů rostlinného růstu auxinového typu je klíčový pro úspěšnost rhizogeneze.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši a na základě získaných znalostí o kultivačních médiích navrhnout vhodné složení médií pro zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro*. Po převedení rostlin do sterilních podmínek bylo cílem sledovat průběh zakořeňování rostlin a hodnotit úspěšnost na jednotlivých médiích.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Botanická charakteristika révy vinné

3.1.1 Botanické zařazení révy vinné

Druh: *Vitis vinifera*

Rod: *Vitis*

Čeleď: *Vitaceae*

Řád: *Vitales*

Třída: *Rosophida*

Oddělení: *Magnoliophyta*

Podříše: *Tracheobionta*

Říše: *Plantae*

3.1.2 Původ, klasifikace a rozšíření rodu *Vitis* L.

Pavloušek (2011) uvádí že čeleď *Vitaceae* L. zahrnuje asi 700 druhů zařazených do 14 rodů. K hospodářsky nejvýznamnějším rodům patří *Vitis* L. (réva), který se využívá pro produkci hroznů a k výrobě vína prakticky po celém světě.

Z okrasného zahradnictví je to *Cissus* L., *Ampelopsis* Planch., *Ampelocissus* Planch. a *Parthenocissus* Planch. Pro vinohradnictví je důležitá klasifikace dle Planchona (1887), který rozděluje rod *Vitis* L. na dva odlišné podrody – *Muscadinia* a *Euvitis*.

3.1.3 Podrod *Muscadinia*

Podrod *Muscadinia* obsahuje tři druhy – *Muscadinia munsoniana*, *Muscadinia popenoi* a nejvýznamější *Muscadinia rotundifolia*. Divoký botanický druh *Muscadinia rotundifolia* je původem z jihovýchodní části Spojených států, má velmi vysokou odolnost proti hád'átkům, plísni, černé hnilobě a rzi. Díky šlechtění odrůd odolných vůči plísnovým chorobám je možné volit ekologičtější způsob pěstování révy vinné, tedy bez rozsáhlé aplikace fungicidů, jejichž použití je nákladné, náročné na pracovní sílu a může mít negativní dopad na životní prostředí. Druhy podrodu *Muscadinia* mají vyšší počet chromozomů ($2n=40$) než podrod *Euvitis* ($2n=38$) a liší se také morfologickými vlatnostmi (Pap, 2016).

3.1.4 Podrod *Euvitis*

Podrod *Euvitis* má asi 70 druhů pocházejících ze tří areálů rozšíření. Nejvíce jich vyrůstá v lesích Severní Ameriky a Kanady (révy americké), které mají taktéž zvýšenou odolnost proti některým škodlivým činitelům, s nimiž se během svého tisíciletého vývoje setkávaly. Jejich hrozny jsou většinou malé, s drobnými, těžko požitelnými bobulemi. Víno získané z takových hroznů je nízké jakosti a s nepříjemnými aromatickými látkami po liščině nebo jahodách, se škrabavou kyselinou a často i hořké. Díky odolnosti proti škodlivým činitelům se některé z amerických rév využívají ve šlechtění k tvorbě podnoží odolné k révokazu. Jiné slouží ke šlechtění odrůd odolných proti houbovým chorobám. Menší počet druhů pochází z Asie (révy asijské). Mezi nimi je šlechtitelsky nejdůležitější réva amurská, *Vitis amurensis* Rupr., díky své vysoké mrazuodolnosti, krátkému vegetačním období a zvýšené odolnosti proti houbovým chorobám.

Z Evropy pochází jediný druh-réva evropská, nazývaná též réva ušlechtilá-*Vitis vinifera* L. Pochází z oblasti Kavkazu a byla postupně hojně šlechtěna vyspělými kulturami v oblasti Orientu a východního Středomoří. Odtud se dostaly odrůdy k Féniciánům, poté prostřednictvím Řeků do západní Evropy, a nakonec je Římané rozšířili do celé Evropy. Jedná se o předchůdce dnes pěstovaných kulturních odrůd révy vinné, které náleží k podrodu *Vitis vinifera* poddruhu *sativa* Hegi. (Hubáček a Kraus, 1982; Sedlo, 1994)

3.2 Morfologie révy vinné

Réva vinná nebyla vždy typickou liánou a neměla ani úponky. Původně byla keřovitou rostlinou, rostoucí v lesostepi na slunných místech. Při pohlcování slunných míst lesem hrozilo, že nízko rostoucí révu zadusí. Postupem času začala vytvářet kmen a úponky a změnila se na popínavou révu (Kraus a kol., 2000; Kraus, 2012). Dlouhodobý vývoj révovitých rostlin v lesních podmínkách Evropy, Asie a Ameriky způsobil, že rostliny začaly vytvářet liány, které se pnou po kmenech stromů, aby zachytily dostatek světla pro svoji asimilační činnost.

Réva vinná je vytrvalá rostlina s oboupohlavními květy, hrozny a bobulemi sloužící pro výrobu vína nebo pro přímý konzum. V podmínkách mírného pásu je pěstována na opěrných drátěnkách a konstrukcích. Světlo milnost je důležitou vlastností u révy vinné (Kraus, 2012).

Révový keř můžeme rozdělit na nadzemní a na podzemní část. Nadzemní část tvoří dřevnaté a zelené části keře. Mezi dřevnaté části patří staré, dvouleté a jednoleté dřevo, mezi staré dřevo patří kmen a kordonová ramena. Jednoleté dřevo je zdřevnatělý letorost po opadu listů a ukončení vegetace. (Pavloušek, 2011). Podzemní část tvoří kořenový systém.

3.2.1 Kořenový systém révy vinné

K hlavním funkcím kořenového systému patří absorpce vody a minerálních látek, produkce hormonů zajišťujících rostlinné funkce, upevnění révového keře v půdě a ukládání sacharidů a minerálních látek pro budoucí využití. Kořenový systém zajišťuje důležité biochemické a fyziologické funkce a bylo prokázáno, že jak výtěžnost keře, tak kvalita hroznů závisí na zdravotním stavu kořenů (Morlat, Jaquet, 1993)

Kořenový systém révy vinné je tvořen kořenovým kmenem. Na kořenovém kmenu se vytváří tři typy kořenů-hlavní, vedlejší a povrchové. Povrchové neboli rosné kořeny vyrůstají z části těsně pod povrchem půdy. Rosné kořeny nejsou žádoucí a musejí být především 1-4 roky po výsadbě odstraňovány. V tomto období se tvoří nejčastěji a jestliže mají podmínky pro rozvoj, rostlina může zakořenit pouze těsně pod povrchem půdy. Pokud vyrůstají z ušlechtilé odrůdy může se rostlina stát pravokořennou a tím náchylnou k napadení révokazem. Hlavní kořeny jsou mohutnější a bývají rozvětveny v závislosti na typu podnože. Na jemných kořenech narůstá kořenové vlášení s aktivními kořenovými špičkami odebírajících vodu a v ní rozpuštěné živiny. (Sedlo, 1994) Kořenové vlásky jsou velice tenké (asi 10 μm v průměru) a pronikají i přes nejmenší půdní póry. Představují až 60 % z celkové plochy kořenového systému. Největší kořenová hmota se nachází obvykle v hloubce 0,3-0,4 m (Pavloušek, 2011).

Hlavní kořeny v závislosti na mateční hornině, hloubce podzemních vod nebo typu půdy mohou prorůst až do hloubky 30 metrů (Galet, 2000). Hlouběji dorůstají v kamenitých a písčitých půdách než v utužených půdách s vysokým podílem jílovitých částic. Nejvýznamnější jsou ale vedlejší kořeny, které se tvoří až po výsadbě a vyrůstá z nich velký objem kořenového vlášení, které slouží k příjmu vody a živin z půdy, čímž zabezpečují kvalitní růst a vývoj révového keře. Důležité je tedy zapěstovat vedlejší kořeny již v prvních letech po výsadbě (Pavloušek, 2011).

3.3 Rozmnožování révy vinné

Rozmnožování révy vinné je důležitým aspektem v produkci révy vinné. Révu vinnou lze rozmnožovat nepohlavně čili vegetativně, nebo pohlavně čili generativně.

3.3.1 Generativní způsob rozmnožování

Generativní způsob rozmnožování se využívá při šlechtění nových odrůd révy vinné. Rostliny jsou rozmnožovány pohlavně pomocí semen. Z každého semene, které vzniklo spontánním nebo cíleným opylováním, může potenciale vzniknout nová odrůda. Rostliny množené generativním způsobem nedědí znaky a vlastnosti rodičů, mají variabilní morfologické a fyziologické vlastnosti (Pavloušek, 2011).

3.3.2 Vegetativní způsob rozmnožování

K vegetativnímu rozmnožování slouží různé části rostliny, které jsou schopné zakořenit a regenerační schopností obnovit chybějící orgány. Vegetativního způsobu množení (řízkování a roubování), využíváme v pěstitelské praxi při rozmnožování podnožových a ušlechtilých odrůd révy vinné.

Tento způsob rozmnožování se rozšířil zejména v důsledku výskytu *Dactulosphaera vitifoliae* v 2. polovině 19. století. Českým názvem Mšička révokaz se označuje velmi nebezpečný škůdce vinic, který může parazitovat na kořenovém systému i na listech. Listová forma révokazu způsobuje tvorbu hálek, ve kterých se nachází vajíčka škůdce. Zmenšuje se tak fotosynteticky aktivní listová plocha a může dojít ke snížení výnosu a zhoršení kvality hroznů.

Kořenová forma se vyskytuje hlavně na kořenovém systému evropské révy vinné – *Vitis vinifera L.* Kořenová forma je nebezpečná tím, že vytváří na kořenech nádory, které se označují jako tuberosity a nodosity. Tuberosity dokáží narušit vodivá pletiva hlavních kořenů a tím způsobí postupné odumírání keře. Jediný způsob boje proti *Dactulosphaera vitifoliae* je využívání rezistentních a tolerantních podnoží. Dalšími důvody pro používání podnoží je ovlivnění intenzity růstu, přizpůsobení půdním podmínkám stanoviště, zvýšená odolnost vůči chloróze nebo odolnost vůči zimním mrazíkům (Pavloušek 2009). Vegetativní způsob množení se využívá především proto, aby se beze změny udržely kladné vlastnosti vyšlechtěných kulturních rostlin (Kincl, 2000).

3.4 Kultivace révy vinné v podmínkách in vitro

Bauer v roce 1939 definoval explantát jako fragment živého pletiva, celý orgán, nebo komplex orgánů, který je vytržený z korelačních vztahů k celku a je pěstován v umělých podmínkách. Explantaci můžeme také definovat jako aseptickou kultivaci rostlin a jejich částí na sterilních živných půdách v podmínkách, které můžeme kontrolovat a rostliny lze pěstovat ve skleněné nebo plastové nádobě (Hradilík, 2005).

Na rozdíl od živočichů, kde procesy buněčné a tkáňové diferenciaci jsou obecně ireverzibilní, existuje u rostlin schopnost přechodu diferenciovaných buněk a pletiv do meristemického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením a následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů, respektive celých rostlin. Rostlinná somatická buňka je totipotentní, tj. obsahuje kompletní genetickou informaci nutnou k vývoji celistvého organismu. Za určitých podmínek, které mohou být v podmínkách in vitro definovány a kontrolovány, jsou morfogenetické procesy dovršeny regenerací celých rostlin. Kultivaci in vitro lze využít v experimentální biologii nebo k získání nových genetických zdrojů (Novák, 1990).

3.4.1 Rostlinné explantáty a jejich historie

Na začátku 20. století německý botanik Gottlieb Haberlandt kultivoval izolovaná pletiva jednoděložných rostlin. Byl to pozoruhodný počin vzhledem k tomu, jak málo byla v té době prozkoumána rostlinná fyziologie. Bohužel Haberlandtem kultivované rostlinné buňky se dále nedělily, a tak nemohl dokázat svoji teorii o jejich totipotenci. Pravděpodobným důvodem jeho neúspěchu bylo to, že kultivační médium neobsahovalo látky potřebné pro buněčné dělení a proliferaci, tedy regulátory rostlinného růstu. Ty v té době ještě nebyly objeveny. V roce 1934 byl objeven první regulátor rostlinného růstu kyselina indolyloctová. Kyselina indolyloctová je přírodně se vyskytující regulátor rostlinného růstu a patří do třídy auxinů. Během 30. let se díky tomuto objevu podařilo zdokonalit metody explantace. V roce 1961 publikovali Gifford a Hewith první odbornou práci zabývající se mikropropagací v podmínkách *in vitro* u révy vinné. Již v letech 1985-1989 byla využívána metoda velkovýrobní techniky množení *in vitro* u révy vinné v praxi a bylo namnoženo několik tisíc rostlin (Trigiano, 2000).

3.4.2 Techniky kultivace révy vinné v podmínkách *in vitro*

K rozmnožování rostlin v *in vitro* podmínkách lze použít několik metod. V závislosti na druhu rostliny lze využít čtyři základní a nejpoužívanější metody: kalusovou kulturu, emryokulturu, kulturu izolovaných orgánů a meristémovou kulturu.

Kalusová kultura

Termínem kalus označujeme soubor nediferenciovaných parenchymatických buněk. Lze jej odvodit z různých částí rostlin jako například ze vzrostlých vrcholů, stonků nebo nodálních segmentů. V *in vivo* podmínkách se vytváří při poranění rostliny a chrání ránu poškozenou například řezem dřevin. V *in vitro* podmínkách je kalus indukován přítomností auxinů a cytokininů v živném médiu. Koncentrace auxinů by měla být poměrně vysoká (1-10 mg.l⁻¹). Kalusová kultura se řadí mezi genotypově nestabilní což znamená, že se v praxi může využívat ve šlechtění rostlin díky výskytu mutací a dosažení genetické variability (Edwin a kol., 2007).

Kultura izolovaných orgánů

Kultura izolovaných orgánů, při níž se odebírají pupenové explantáty nebo internodie s laterálními pupeny, slouží ke kultivaci užitkových a nekulturních dřevin. Vzniklé rostliny jsou vhodné k dalšímu použití při rozmnožování v *in vitro* podmínkách a zachovávají si genetickou stabilitu (Bajaj, 1992).

Embryokultura

Kultivace embryí *in vitro* je nejstarší oblast explantátových kultur, kdy bylo dosaženo regenerace celých rostlin z izolované části organismu. Základní složkou kultivačních médií pro izolovaná embrya jsou zdroje uhlohydrátů-cukry. Růstové látky a vitamíny jsou klíčové složky kultivačních médií pro izolovaná embrya, stejně jako pro ostatní explantáty. Metoda embryokultur se využívá k záchraně embryí při křížení odrůd révy vinné, které tvoří málo semen, nebo při křížení odrůd s dostatečným počtem semen s odrůdami které tvoří semen málo.

Meristémová kultura

Meristém rostliny může být definován jako struktura tvořená buňkami, které jsou schopné dělení a postupné diferenciaci. Apikální meristém stonku je totipotentní struktura nezávislá na zbytku rostliny. Pokud je oddělen apikální meristém od intaktní mateřské rostliny, zachová si schopnost regenerace. Pro růst izolovaných meristémů jsou vhodná běžná kultivační média jako Murashige a Skoog a Gamborg et al. (Novák, 1990). Tato metoda umožňuje získání viruprostých rostlin a k jejímu založení se používají vrcholové či axilární pupeny. Při této metodě mikropropagace je zachována genetická stabilita u získaného rostlinného materiálu (Šebánek a Sladký 1988).

3.4.3 Metody sterilizace rostlinného materiálu

Rostliny nesou na svém povrchu velké množství mikroorganismů, a pokud není explantátovaná část desinfikována, dochází k pomnožení mikroorganismů na živném médiu a poškození explantátu. K desinfekci se využívají různé desinfekční roztoky. Ty musí likvidovat plísně a bakterie a nesmí příliš poškodit rostlinná pletiva. Proto je důležité dbát na správnou koncentraci dané desinfekční látky.

Mezi používané účinné látky patří chlorid rtuťnatý, který se používá v koncentracích 0,1-1,0 % a doba působení se liší v závislosti na typu explantátu od 2 do 25 minut. Dalšími komponenty sterilizačních roztoků může být ethanol používaný v koncentraci 70 % po dobu pěti sekund, bromová voda v koncentraci 1,0-2,0 % po dobu od 2 do 10 minut nebo 10-30 % peroxid vodíku (Grenan, 1989). Lazo-Javalera a kol. (2016) zkoumali účinky různých desinfekčních činidel na jednonodální segmenty révy vinné. Pracovali se dvěma různými koncentracemi chlornanu sodného a s různou dobou působení desinfekčního činidla na explantáty. Koncentrace 0,6 % NaOCl s dobou působení 15, 30 a 60 minut a koncentrace 1,3 % NaOCl s dobou působení 15, 30 a 60 minut. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci 1,3 % NaOCl s dobou působení 60 minut, kdy bylo 80 % explantátů bez kontaminace.

3.4.4 Metody sterilizace prostředí

Sterilita manipulačního prostředí je zajištěna flow boxem. Toto zařízení filtrují nasávaný vzduch a na filtrech jsou zachyceny mikroorganismy i jejich spory. Takto upravený sterilní vzduch proudí horizontálně a omývá pracovní plochu čímž zamezuje přístupu infekce. Pracovní plocha laminárního boxu je sterilním prostředím a dovoluje manipulaci s rostlinným materiálem bez rizika kontaminace. Vnitřní prostor je nezbytné před každou manipulací s rostlinným materiálem desinfikovat 70 % ethanolem a použít desinfekci k očištění rukou. Uvnitř flow boxu by měly být připraveny všechny standardně používané nástroje jako skalpel, pinzeta, tácky, nádoby s roztoky a podobně (Trigiano, 2000).

3.4.5 Sterilizace v autoklávu

Autokláv je používán pro sterilizaci pipet, filtrů, vody, zásobních živných médií a nádob s živnými médii určenými pro explantaci rostlinného materiálu. Média pro rostlinné explantáty mimo to, že poskytují ideální podmínky pro explantaci, představují také ideální substrát pro množení a růst hub a bakterií. Autoklávování je metoda sterilizace vodní parou za vysokého tlaku. Uvnitř autoklávu dochází ke zvýšení tlaku na 105 kPa a teplota vnitřního prostoru stoupne na 121 °C. Autoklávování trvá 15-20 minut v závislosti na velikosti sterilizovaných objektů. Výhodou sterilizace v autoklávu je účinnost tohoto postupu, protože při teplotě 121 °C jsou ničeny jak vegetativní, tak generativní formy mikroorganismů. Kovové nástroje mohou vlivem páry zrezivět a ztupět, proto je lepší použít metodu sterilizace suchým teplem (Sharma, 2012)



Obr.1 Autokláv s připravenými médii k autoklávování

3.4.6 Kultivační média pro rostlinné explantáty

Izolací explantátu z mateřské rostliny dochází k eliminaci výživy dodávané touto rostlinou, proto musí explantáty přijímat k růstu potřebné látky z média. Kultivační médium svým složením musí plně zajistit výživu rostlinného explantátu na poměrně dlouhou dobu. K výživě rostlinných explantátů jsou nezbytné makrobiogenní a mikrobiogenní prvky, sacharidy, vitamíny a růstové regulátory (Šebánek, Sladký, 1988).

3.4.6.1 Voda

Voda je základní složkou pro výrobu médií pro rostlinné explantáty. Obyčejná kohoutková voda obsahuje kationty, anionty, organické nečistoty, mikroorganismy a plyny. K čištění vody se používají různé metody, například filtrace vody přes filtry s aktivním uhlím k odstranění organických nečistot a chlóru nebo deionizace/demineralizace vody, což je proces odstraňování rozpustných solí z vody iontovou výměnou, která se uskutečňuje pomocí iontoměničů. Tyto iontoměniče-katexy a anexy mají schopnost zachytit ionty solí přítomných ve vodě a vyměňovat je za vodíkové a hydroxilové ionty. Katexy odstraňují kationty rozpuštěných solí a anexy anionty rozpuštěných solí.

Dalším technologickým postupem k získání vysoce čisté vody je využití metody reverzní osmózy. Reverzní osmóza je proces, který využívá semipermeabilní membrány k oddělení a odstranění koloidních částic, bakterií a nečistot. Voda je přes tuto membránu protlačována pod velkým tlakem. V dalším stupni čištění voda protéká přes filtr se spékáním aktivním uhlím, kde se zbaví chlóru a organických látek absorpčním způsobem. Hlavní jednotkou celého přístroje je polopropustná membrána pracující na principu reverzní osmózy. Mikrootvory v membráně projdou pod tlakem pouze molekuly vody, ostatní látky odtečou s odpadní vodou (Trigiano, 2000).

3.4.6.2 Agar

Agar je používán k přeměně tekutého kultivačního média na gel a umožňuje tak stabilní umístění explantátu v médiu a kontakt explantátu se vzduchem. Agar je přírodní polysacharid schopný vázat vodu, vyráběný z mořských řas. Do média je přidáván v koncentracích 0,5-1,0 %. Výsledkem přidání většího množství agaru je tužší médium, což může negativně ovlivnit růst explantátu. Pokud je použita nižší koncentrace (0,4%) nebo pokud je pH nízké, dojde k vytvoření příliš řídkého média. Pro médium s 0,6% agaru je ideální hodnota pH nad 4,8 (Trigiano, 2011). Za normálních podmínek agar tuhne při 45 °C, takže vzniklý gel je stabilní při teplotách obvyklých pro práci s explantáty. Vedle agaru je možné pevné médium vytvořit pomocí dalších látek jako například agarózy, Phytagelu a Gerlite, které se používají v koncentraci 1,25-2,50 g/l (Hradilík, 2005).

3.4.6.3 Vitamíny

V podmínkách explantace může být snížena schopnost rostliny syntetizovat vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Výsledkem je zpomalení, nebo zastavení růstu explantátu. Proto mohou být pro rostlinné buňky, pletiva nebo orgány vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu.

Mezi nejpoužívanější vitamíny přidávané do živných médií patří:

thiamin 0,1-10,0 mg.l⁻¹

kyselina nikotinová 0,1-5,0mg.l⁻¹

pyridoxin 0,1-10,0 mg.l⁻¹

myo-inositol 50-5000 mg.l⁻¹

V menších dávkách se také někdy přidává kyselina pantothenová, biotin, kyselina listová, riboflavin atd. (Procházka, Šebánek, 1997, Hradilík, 2005).

3.4.6.4 Cukry

Cukr je velice důležitou složkou každého živného média a jeho přídavek je klíčový pro růst explantátu. Většina rostlin není schopná v podmínkách *in vitro* efektivní fotosyntézy z důvodu nedostatku chlorofylu, omezené výměny plynů a obsahu CO₂ v kultivačních nádobách. Jako zdroj uhlíku a energie je používána dávka 20-60 g.l⁻¹ sacharózy. Mohou být také použity ostatní monosacharidy nebo disacharidy jako například glukóza, fruktóza, sorbitol a maltóza (Coffin, 1976).

3.4.6.5 Makroelementy

V kultivačních médiích jsou nejdůležitějšími makroelementy fosfor, draslík, dusík, vápník, síra a hořčík. Optimální koncentraci nelze přesně určit, liší se podle druhu rostliny a podmínkách explantace.

Dusík je hlavní minerální látkou v rostlinných pletivech a většina dusíku je přijímána z půdy kořeny. Dusík je v půdě přítomen v organické a anorganické formě. Je součástí aminokyselin, amidů, bílkovin, nukleových kyselin, chlorofylu, enzymů a dalších biologicky aktivních látek. V rostlinách se jeho obsah pohybuje ve značném rozmezí v závislosti na druhu, orgánu a stáří rostliny (Lambers, 2005). V počátečních fázích vývoje je jeho obsah vysoký a s tvorbou biomasy postupně klesá.

Obecně by mělo médium obsahovat alespoň 25-60 Nm dusíku v anorganické formě (z toho 25-40 Nm ve formě nitrátové a 2-20 Nm ve formě amonné). Pokud je dusík do média dodán společně v nitrátové formě i ve formě amonných solí, je dosaženo mnohem lepšího růstu (Sladký, Šebánek, 1988). Za normálních podmínek má nitrát pro výživu rostlin největší význam. Kořeny ho přijímají aktivně ve směru elektrochemického gradientu. V protikladu s příjmem je výdej NO_3 procesem pasivním. Nitrátový dusík je přijímán při kyselějších pH. Při pH 6,8 se příjmem NO_3 a NH_4 v rostlinách může vyrovnat. Amonný iont působí inhibičně na příjem nitrátové formy.

Fosfor je nedílnou součástí metabolických dějů, složkou nukleových kyselin a buněčných membrán, které tvoří povrch každé buňky, ohraničují ji a mají podpůrnou funkci. Hlavní buněčné procesy jako fotosyntéza a respirace jsou iniciovány inorganickými fosfáty nebo jejich organickými deriváty. Fosfor patří mezi živiny v půdě málo pohyblivé (Lambers, 2005).

Draslík je nepostradatelný pro fotosyntézu a dýchání rostlin, je důležitý pro hospodaření rostliny s vodou. Nachází se jako volný draselný iont v buněčné šťávě, a tak určuje osmotickou hodnotu. Při nedostatku draslíku klesá turgor v rostlině a listy mohou vadnout. Do médií se dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu (Procházka, 1998).

Vápník se podílí na fyziologických funkcích, zejména na stavbě buněčných stěn a na reakci s organickými kyselinami. Ovlivňuje prodlužovací růst buněk, růst kořenů a meristematických pletiv. Nedostatek vápníku se projevuje svinováním okrajů listů směrem nahoru, zabrzděním růstu a odumíráním vrcholového meristému. Při nadbytku rostlina špatně přijímá Mn, B, Fe což vede k chloróze.

Hořčík má největší význam jako stavební součást chlorofylu, a tak ovlivňuje fotosyntézu. Podílí se na tvorbě aminokyselin a zlepšuje transport asimilátů v rostlině. Silný nedostatek prvku omezuje funkci vodivých pletiv (Pavloušek, 2011).

Síra je stavební součást některých aminokyselin, bílkovin a vitamínů. Do média se přidává ve formě síranů. Spolu s dusíkem se účastní syntézy bílkovin.

3.4.6.6 Mikroelementy

Mezi mikroelementy používané pro kultivaci rostlinných explantátů řadíme železo, mangan, zinek, bór, měď, kobalt a molybden. Koncentrace těchto prvků v živném médiu se pohybuje v rozmezí 0,1 μM do 100 μM .

Železo se dodává společně se zinkem v chelátové formě, má význam pro dýchání a fotosyntézu, je potřebný při tvorbě chlorofylu. Nedostatek železa způsobuje chlorózu a jeho nadbytek brzdí příjem Mn (Procházka, 1998).

Měď ovlivňuje biochemické reakce a podílí se na tvorbě chlorofylu. Velký význam má pro tvorbu sacharidů. Mezi mědí, železem a manganem existuje antagonismus, takže vysoký obsah mědi může vyvolávat nedostatek Fe a Mn (Pavloušek, 2011)

Mangan je důležitý pro kvalitní průběh fotosyntézy. Má význam pro hospodaření rostliny s vodou. Při nedostatku manganu se na listech objevuje chloróza.

Zinek, bór a další mikroelementy jsou v médiu přítomné v malém množství a hrají úlohu stimulatorů specifických procesů, například syntézy auxinů (Procházka, 1988).

3.4.6.7 Fytohormony

Růst a vývoj rostlin byl dlouhou dobu spojován pouze s výživou rostlin. V roce 1880 přišel německý botanik Julius Sachs s hypotézou tvorby specifických látek v rostlinách. Domníval se, že některé látky ovlivňují růst stonku, jiné růst listu, kořene nebo květu. O samotný objev fytohormonů se zasloužil F.W. Went a to v roce 1928. Dále se touto problematikou zabývali F. Skoog, R. Snow a mnoho dalších. K objevu fytohormonů přispěla i česká botanická škola profesorů Bohumila Němce a Rudolfa Dostála.

Z výzkumu zákonitostí růstu a vývoje rostlin vyplývá, že v těchto procesech hrají významnou roli fytohormony a jejich interakce. Růstový proces není ovlivňován pouze jedním fytohormonem a také neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jeden růstový proces (Procházka, Šebánek a kol. 1997). Přírodní hormony ovlivňují místně přenos genetické informace z jádra buněk pletiv, a tak působí na funkci enzymů a jiných proteinů v cytoplazmě a na membránách. V tomto působení hormony různě interferují, působí buď společně nebo proti sobě v návaznosti na vnitřní nebo vnější podněty. Složení hormonů určuje jejich výslednou aktivitu a tím růst a vývin orgánů.

Účinky rostlinných hormonů jsou znatelné už při velmi malých koncentracích (0,001-10 μM). Iniciují rozvoj a růst kořenů, výhonů a stimulují buněčné dělení. V některých případech je rostlina autotrofní a dokáže se sama zásobit regulátory rostlinného růstu. Ve většině případů je ale nutné tyto látky do média přidat (Trigiano, 2011). Nejdůležitější skupinou fytohormonů používaných při kultivaci rostlin *in vitro* jsou auxiny, cytokyniny, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. Mimo skupiny existují v rostlinách další látky regulující růst, které nejsou řazeny mezi fytohormony, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích. Patří sem zejména polyaminy, oligosacharidy a skupina fenolických látek. Cytokininy, gibereliny a auxiny působí zejména stimulačně, naopak kyselina abscisová a ethylen působí inhibičně (Macháková, 1998)

Auxiny

Auxin je nejdéle známým fytohormonem. Vzniká v primárních meristémech, zejména ve vzrostlém vrcholu stonku, v mladých listech, ale i v sekundárních meristémech. Podporuje prodlužovací růst segmentů stonku a apikální dominanci, stimuluje také plošný růst buněčných stěn a dělení buněk (Kincl, 2000). Nejznámější z auxinových fytohormonů je heteroauxin kyselina indolyloctová (IAA). S růstovou stimulací souvisí i úloha auxinu v regulaci tropismů. Pod vlivem gravitace dochází k nerovnoměrné laterální distribuci IAA a v důsledku toho k nerovnoměrnému růstu. Stimulaci růstu vyvolává IAA při koncentracích 10^{-7} - 10^{-5} mol.l⁻¹. Vyšší koncentrace naopak často růst inhibují v důsledku zvýšené tvorby etylenu. Dalším auxinem je kyselina indolylmásečná (IBA). (Procházka, Šebánek, 1997).

Další významný účinek auxinů je stimulace tvorby adventivních kořenů na segmentech stonků i u explantátů. Auxiny se používají ke stimulaci zakořeňování řízků. Řízky z vrcholové části letorostů obsahují více auxinů, a proto zakořeňují lépe než z bazální části letorostu, kde je jejich obsah nižší. Vrcholové řízky také lépe reagují na dodání syntetických auxinů. Auxiny kontrolují v rostlině tvorbu a růst kořene i postranních kořenů. Nejvíce auxinů je obsaženo v kořenové čepičce a směrem ke stonku se jejich koncentrace stále více snižuje (Torrey, 1976). Tento jev způsobuje systém IAA-oxydázy, který je v kořenech velmi silný. Koncentrace auxinů se tedy se vzdáleností od vrcholku kořene mění. Silnější koncentrace podněcující iniciaci hlavního kořene a postranních kořenů ustupují nižším koncentracím podněcujícím jejich růst. Vysoké koncentrace auxinů brzdí zakládání i růst kořenů (Kutina, 1977). Do kultivačních médií bývají auxiny přidávány společně s cytokininy (Kincl, 2000).

Mezi auxiny používané do živných médií patří:

Kyselina indolyl-3-octová (IAA)

Kyselina indolyl-3-másečná (IBA)

Kyselina naftyloctová (NAA)

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4,5-T)

Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony syntetizované v kořenových vrcholech a translokovány symplasticky lýkem i xylémem do lodyhy a listů. Zde působí především svým vlivem na nukleové kyseliny jako konstruktivní činitel při budování jednotlivých orgánů a jejich udržování v dobrém zdravotním stavu a funkci. Bylo zjištěno, že mají vliv na mnoho vývojových, biochemických, metabolických a fyziologických procesů v interakci s ostatními fytohormony. Jedna z nejdůležitějších funkcí je regulace a stimulace buněčného dělení a průběh buněčného cyklu (Mok, 2000). Se stimulací dělení buněk je spjata urychlení tvorby DNA. Obecně lze říct, že cytokininy stimulují metabolismus rostlin, zvláště pak RNA a proteosyntézu. Proto zpomalují stárnutí buněk a zvyšují jejich odolnost proti nepříznivým vlivům prostředí (Kincl, 2000). Indukují také aktivitu meristémů a tvorbu pupenů. Výrazně snižují apikální dominanci a podporují růst axilárních pupenů. Cytokininy se tvoří v kořenech a podněcují aktivitu dělení buněk a v nízkých koncentracích mohou stimulovat zakládání kořenů, je-li zároveň přítomen dostatek auxinů, velmi často však tvorbu kořenů brzdí. Cytokininy jsou také často schopny ovlivňovat dlouhivý růst kořenů (Kutina, 1977).

Mezi používané cytokininy do živných médií patří:

Benzylaminopurin (BAP)

Isopentenyladenin (2iP)

Benzyladenin (BA)

Furfurylaminopurin (kinetin)

zeatin

Benzyladenin (BA) vykazuje výrazně vyšší cytokininovou aktivitu než přirozeně se objevující zeatin.

Gibereliny

V dnešní době je známo více jak 130 druhů derivátů s giberelanovým skeletem. Poprvé byly objeveny v roce 1938 kdy byly izolovány z houby *Fusarium moniliforme*. Houba se pěstuje v tekutém živném prostředí a gibereliny se z filtrátu kultivační tekutiny (Kincl, 2000). Gibereliny nejsou tak často využívány pro kultivaci rostlinných explantátů, někdy se do médií přidávají pro stimulaci růstu. Gibereliny stimulují tvorbu kalusu a růst zakrslých rostlin. Pokud v médiu není přítomen auxin, účinky giberelinů se málokdy projeví (Edwin a kol., 2008).

Gibereliny jsou nezbytné pro mnoho procesů v rostlinách, včetně klíčení semen, růst internodií u listů, zrání pylu a indukci kvetení (Daviere, 2013). Stejně jako u auxinů tak i giberelinů je známo, že stimulují růst. Zvyšují dělení mladých buněk v meristematických oblastech a prodlužování buněk v oblastech dlouhivého růstu. Zvyšují také průměr buněk a ovlivňují tloušťku buněčných stěn u dřevitých vláken. Na rozdíl od auxinů gibereliny neovlivňují kořenový systém, ale stimulují jen nadzemní části rostlin. Aplikace giberelinů ke zvýšení nasazení plodů je ve většině případů efektivnější než aplikace auxinů. Tento účinek je nejefektivnější u jabloní a révy vinné (Procházka a kol., 1998).

Kyselina abscisová

Kyselina abscisová se v rostlinách nachází ve velmi nízké koncentraci. Je syntetizována v dospělých listech, semenech, pupenech a hlízách, mladých špičkách kořenů a v menším množství u všech dalších orgánů. Kyselina abscisová je do živných médií používána jen výjimečně pro indukci somatických embryí, stimulaci tuberizace, indukci kvetení, navození dormance nebo zabrzdění růstu explantátu (Šebánek, 1999).

Etylen

Etylen je považován za hormon způsobující stárnutí rostlin. Etylen může být produkován při mechanickém poranění rostliny, ale i v důsledku choroby. V rostlinách může působit celou řadu reakcí v závislosti na stáří rostliny a na její citlivosti na etylen (ztráta chlorofylu, odumírání částí rostlin, úhyn rostliny). Komerčně se využívá k posklizňovému dozrávání rajčat, banánů, hrušek a dalších plodin (Blankenship, 2000).

Etylen je produkován v kultivačním prostředí samotnými rostlinami. Zdrojem etylenu mohou být také samotné složky kultivačního média, nebo pryžové uzávěry kultivačních nádob. Produkce endogenního etylenu je ovlivňována dalšími rostlinnými hormony, především auxinem (Procházka a kol., 1998).

3.4.7 Zakořeňování v podmínkách *in vitro*

Zakořeňování prýtů ve sterilních podmínkách *in vitro* je poměrně pracné a zvyšuje náklady na množení rostlin. Dle Hradilíka (2005) pouze malé množství rostlin tvoří kořeny na živném médiu s obsahem cytokininů a u všech ostatních je nezbytný přenos prýtů k zakořeňování na nové médium s obsahem auxinů. Vhodné koncentrace jsou u IAA v rozmezí 0,1-10 mg.l⁻¹, NAA 0,05-1,0 mg.l⁻¹, IBA 0,1-10 mg.l⁻¹. Pro zakořeňování je někdy doporučováno poloviční médium s redukovaným (50 %) obsahem makro a mikroelementů. Nižší koncentrace živin v médiu může také představovat určitý stres, který signalizuje nedostatek živin v prostředí a iniciuje intenzivní tvorbu adventivních kořenů. Na pevných agarových půdách se často vyvíjejí kořeny bez kořenových vlásků což souvisí s nedostatkem kyslíku v pevném médiu. Pro zakládání a růst adventivních kořenů je fyziologickým prostředím tma, přesto světlo většinou zakládání a růst kořenů negativně neovlivňuje. Teplota pro řízenou rhizogenezi se u většiny rostlin pohybuje v rozmezí 25-28 °C.

4 METODIKA

4.1 Kultivační místnost a laboratoř

Běžná laboratoř by měla být rozdělena na část určenou pro přípravu rostlinného materiálu ke kultivaci, na stanoviště pro přípravu médií, místnost pro aseptickou manipulaci atd. Kultivační místnost je většinou jednoduše zařízená, vybavena policemi pro kultivovaný materiál, flow boxem pro aseptickou manipulaci, zářivkami se spínacími hodinami a klimatizací. Pokud je kultivační místnost malá, snadno dochází k nárůstu teploty, proto je kvalitní klimatizace nutností. Dobré proudění vzduchu též zamezuje kondenzaci vody v petriho miskách nebo jiných kultivačních nádobách (Beyl, 2016). Sterilizace kultivačních médií se provádí v autoklávu. Rostlinný materiál je také nutno sterilizovat, nejčastěji je používáno desinfekčních roztoků jako je savo, ethanol $HgCl_2$, chloramin. Pokus probíhal v laboratoři ústavu genetiky Zahradnické fakulty v Lednici. Laboratoř je vybavena všemi výše uvedenými technologiemi.

4.2 Podnožový materiál

Pro založení primární kultury byly vybrány čtyři druhy podnoží-Kober 5BB, Craciunel 2, Kober 125 AA a SO 4.

4.2.1 Kober 5BB-*Vitis Berlandieri* x *Vitis Riparia*

Tuto podnož vyseletoval F. Kober ze série Teleki 5 A, jako vegetativní potomstvo několika keřů podobných vlastností. V roce 1920 bylo zahájeno pěstování této podnože v Rakousku a rozšířila se do všech vinohradnických zemí v Evropě. Kober 5BB je bujně rostoucí podnožová odrůda a také na ni naštěpované odrůdy mají bujný růst. Má velmi dobrou rezistenci vůči révokazu a je také odolná ke kořenovým hád'átkům. Není k nim však rezistentní. Podnož je velmi vhodná pro plodné odrůdy, které nejsou citlivé na sprchávání květenství. Naopak není vhodná pro odrůdy citlivé na sprchávání květenství. Je vhodná do méně výživných půd, protože na půdách s nadměrnou výživou dochází u naštěpovaných odrůd ke špatnému vybarvování hroznů, poškození plísní šedou nebo sprchávání květenství. Nejlepší jsou mírně vlhké, hlinité a sprašové půdy. Podnož je v našich podmínkách tolerantní asi k 15 % aktivního vápníku v půdě. Je méně vhodná pro stanoviště s delším obdobím sucha. Kober 5 BB je mělce kořenící podnož a zakořeňuje velmi dobře. Má krátké vegetační období a dobré vyzrání dřeva.

4.2.2 Craciunel 2 - *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*

Craciunel 2 je rumunská selekce z populace *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* „Kober 5 BB“. Vznikla na výzkumné vinohradnické stanici v Craciunel. Craciunel je bujně rostoucí podnožová odrůda. Také naštěpované odrůdy rostou na této podnoži bujně. Má vysokou odolnost vůči kořenové formě révokazu, je odolná k plísni révové a padlí révovému. Má velmi dobrou afinitu s plodnými odrůdami nenáchylnými na sprchávání. Lze na ni štěpovat i odrůdy citlivé na sprchávání květenství. Vzhledem k vyšší odolnosti vůči suchu je vhodná do lehkých, písčitých, šterkovitých, hlinitých i uléhavých půd. Nesnáší však těžké jílovité půdy. Snáší vyšší obsah aktivního vápníku v půdě (max. 20 %). Ve školce velmi dobře zakořeňuje.

4.2.3 Kober 125 AA - *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*

Odrůdu vyselekoval F. Kober v Klosterneuburgu jako selekci z keřů pocházejících od Telekiho. Kober 125 AA je bujně rostoucí podnožová odrůda. Odrůdy na ní naštěpované mají slabší růst než odrůdy na Kober 5 BB. Podnož má velmi vysokou rezistenci k révokazu. Afinita je dobrá s většinou u nás pěstovaných odrůd. Lze ji použít jak pro odrůdy jakostní, tak pro odrůdy plodné. Není vhodná pro odrůdy s nepravidelnou plodností. Omezuje sprchávání květenství. Je velmi vhodná pro skupinu burgundských odrůd a Tramín červený. Snáší půdy stejnoměrně vlhké a dostatečně hluboké. Není vhodné ji vysazovat do mělkých půd a na suchá stanoviště. Nejvhodnější jsou hlinité a písčitohlinité půdy. Snáší průměrně 14 % aktivního vápníku v půdě. Podnož je velmi podobná podnoži Kober 5 BB, ale na rozdíl od ní má větší toleranci k suchu. Je vhodná zejména do speciálních podmínek a na vysoké pěstitelské tvary.

4.2.4 SO 4 - *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*

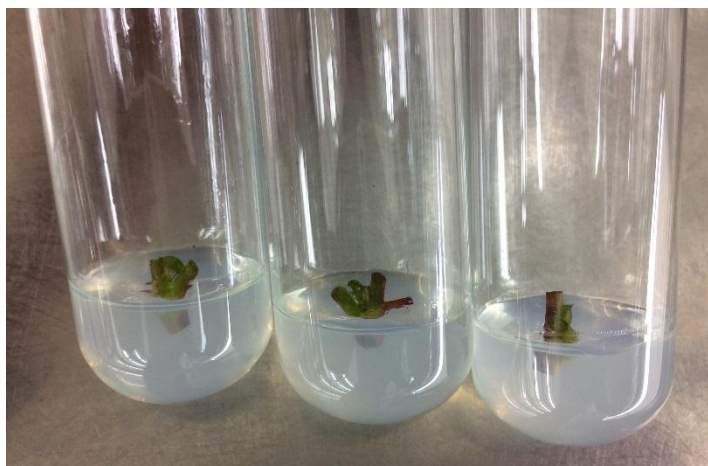
Podnož byla vyselektována Hansem-Christianem Rodrianem v německé vinohradnické škole v Oppenheimu ze selekce Teleki 4. V podnožové vinici má tato odrůda střední růst. Naštěpované odrůdy mají středně bujný růst. Má vysokou rezistenci k révokazu a je rovněž rezistentní ke kořenovým hád'átkům. Má velmi dobrou afinitu s jakostními odrůdami a odrůdami citlivými na sprchávání květenství. Velmi vhodná je pro odrůdy Ryzlink rýnský, Sylvánské zelení, Neuburské, Svatovavřínecké a Veltlínské zelené. Podnož příznivě působí na urychlení dozrávání hroznů naštěpovaných odrůd. Podnož má mělký kořenový systém, toleruje vysoké hodnoty vápna v půdě (až 18 % aktivního vápna) a nejlépe jí vyhovují humózní, stejnoměrně vlhké, hlinité půdy. Není vhodná pro lehké a málo úrodné půdy. Odrůda velmi dobře zakořeňuje, je to ideální podnož pro vinice na středním vedení (Pavloušek, 1999)

4.3 Založení primární kultury

Pro založení primární kultury bylo vybráno médium MS (Murashige, Skoog, 1962), médium pro primární kultury, které je v laboratoři běžně používáno. V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou (30 g·l⁻¹), myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátory rostlinného růstu BA (0,7 mg·l⁻¹), IAA (0,1 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Nakonec bylo pH upraveno na hodnotu 5,8. Připravené médium bylo naplněno do velkých zkumavek v množství 10 ml. Zkumavky byly 20 minut autoklávovány.

Mladé letorosty révy vinné byly odebrány z technického izolátu, následně byly nařezány na jednotlivé jednonodální segmenty o velikosti 5-10 mm. Segmenty byly vloženy do Erlenmayerových baněk a byly zality vodou se saponátem, aby došlo k jejich odmaštění. Voda se saponátem byla slita a následovala povrchová desinfekce, která již probíhala ve sterilních podmínkách flow-boxu. Do Erlenmayerových baněk byl nalit chlorid rtuťnatý v koncentraci 0,2 %. Po čtyřech minutách byly segmenty vyjmuty a byly třikrát propláchnuty sterilizovanou destilovanou vodou. Nakonec byly segmenty zkráceny, aby se zamezilo kontaminaci explantátů chloridem rtuťnatým zbylým v rostlinném pletivu. Po posledním oplachu zůstaly explantáty v destilované vodě, aby nedošlo k jejich poškození vlivem výparu vody.

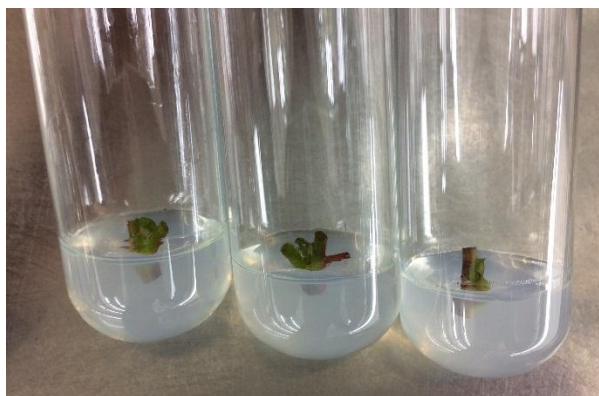
Připravené a desinfikované segmenty byly pinzetou přeneseny do velkých zkumavek s médiem pro primární kultury. Každý segment byl vtlačen do média. Takto připravené vzorky byly kultivovány při teplotě 22 ± 1 °C, fotoperiodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma. K osvětlení byly použity zářivkové trubice s intenzitou $20, 25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr.2 Jednonodální segmenty na kultivačním médiu

Jednonodální segmenty všech čtyř podnoží byly na médiu kultivovány 3 týdny, poté byly z podnoží odebírány prorostlé úžlabní pupeny, které byly pasážovány na čerstvé médium. U některých explantátů se projevila kontaminace. Pokud se kontaminace kultury objevila do týdne po založení, jednalo se pravděpodobně o nedokonalou sterilizaci rostlinného materiálu. Při infekci projevené za deset dní a více jde pravděpodobně o endogenní kontaminaci explantátu.

Nejvíce vyhovující pro další práci s rostlinným materiálem byla podnož CR2, která měla nejvyšší počet prorostlých úžlabních pupenů a ani po druhém pasážování rostliny nenekrotizovaly a byly vitální. U podnoží K5BB, SO 4 a Kober 125 AA docházelo ve větší míře ke žloutnutí listů, nekrotizaci a postupnému odumírání rostlin.



Obr. 3 Jednonodální segmenty podnože K5BB bez známek prorůstání úžlabních pupenů 20. den kultivace



Obr.4 Jednonodální segment podnože CR2 s prorostlými úžlabními pupeny

4.4 Zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro*

Pro kultivaci byly použity rostliny odebrané z primární kultury podnožové odrůdy CR2.

4.4.1 Příprava kultivačních médií

Jako základní médium bylo použito médium Murashige & Skoog (MS) obohacené o vitamíny. Do základního média byly přidány rozdílné dávky kyseliny naftyloctové a kyseliny indolyl-3-octové, a byly tak vytvořeny čtyři typy kultivačních médií.

Složky média Murashige and Skoog	mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	332,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0
H ₃ BO ₃	6,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ . H ₂ O	16,9
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
KNO ₃	1900,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	86,0
Myo-inositol	100,0
Glycine	2,0
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamin HCl	0,1

Tabulka 1: Složení kultivačního média Murashige and Skoog (Trigiano, 2000)

Médium C0

Médium s označením C0 bylo použito jako kontrolní médium a nebyly do něj přidány regulátory rostlinného růstu. V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou (30 g·l⁻¹), myoinositolem (100 mg·l⁻¹). pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

Médium C1

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou (30 g·l⁻¹), myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátory rostlinného růstu NAA (0,15 mg·l⁻¹), IAA (0,15 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

Médium C2

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou (30 g·l⁻¹), myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátorem rostlinného růstu NAA (0,15 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

Médium C3

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou (30 g·l⁻¹), myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátorem rostlinného růstu IAA (0,15 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

Všechny média byly naplněny do velkých zkumavek v množství přibližně 10 ml na každou zkumavku, poté byly zakryty pevným alobalovým víčkem. Zkumavky byly dvacet minut autoklávovány. Před další prací byly kultivační média vychlazené na teplotu přibližně 22 °C.

4.4.2 Založení pokusu

K založení pokusu byly použity pasážované rostliny podnože CR2, která vykazovala nevyšší zdatnost. Rostliny byly skalpelem upraveny na přibližně stejnou velikost, a tak aby na rostlině zůstaly dva až tři listy. Práce probíhala ve sterilních podmínkách flow-boxu, který byl před začátkem práce desinfikován 70 % ethanolem, stejně jako tácky, pinzety a skalpely. Pinzeta a skalpel byly před použitím vloženy na pět vteřin do sterilizační kostky nastavené na 250 °C. Výhonky byly vtlačeny do média a zkumavky byly následně zakryty pevným alobalovým víčkem. Zkumavky s explantáty byly umístěny do stojanů a uloženy na polici v kultivační místnosti. Vzorky byly kultivovány při teplotě 22 ± 1 °C fotoperiodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma. K osvětlení byly použity zářivkové trubice s intenzitou 20, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Réva vinná patří k rostlinám poměrně náročným na teplotu. Pro multiplikaci je nutné udržet teplotu alespoň 22 °C. Při nižší teplotě dochází ke zpomalení růstu, při vyšších teplotách, které jsou vyšší než 25 °C, může dojít k vysychání kultivačního média.



Obr.5 Explantát po založení pokusu na médiu C3

4.4.3 1.Měření

První kontrola proběhla po 11 dnech kdy začaly být patrné změny na některých explantátech.

Médium C0

Na kontrolním médiu bez přidaných regulátorů rostlinného růstu byla po 11 dnech explantace pozorována proliferace kořenů u tří explantátů (cca 2-4 mm), na jednom explantátu se projevila infekce a zbylé vzorky zůstaly beze změny. Infikovaný explantát byl vyřazen.

Médium C1

U šesti explantátů nebyly pozorovány žádné změny, u zbylých devíti byla patrná proliferace kořenů o délce cca 3 mm (Obr.6).



Obr.6 Proliferace kořenů explantátu na médiu C1

Médium C2

U devíti explantátů nebyly pozorovány žádné změny, u šesti explantátů došlo ke znatelnému růstu kořenů do délky cca 5-6 mm. Kořeny jsou silné a objevuje se na nich jemné vlášení (Obr.7).



Obr.7 Explantát na médiu C2 s výrazným růstem kořene s kořenovým vlášením

Médium C3

U média C3 se objevila po 11 dnech explantace infekce u jednoho z explantátů, ten byl z dalšího pozorování vyřazen. U jednoho explantátu bylo již po jedenácti dnech patné prorůstání dvou kořenů o velikosti cca 4 mm. Třináct explantátů netvořilo kořeny.

4.4.4 2.Měření

Kontrola explantátů po 25 dnech

Médium C0

U deseti rostlin nedošlo oproti minulému měření ke změně, rostliny jsou zelené ale netvoří kořeny. U jednoho explantátu začíná být patrná proliferace kořenů. U zbylých tří explantátů kořeny výrazně rostou (cca 1,2 cm).



Obr.8 Explantát na médiu **C0** s výrazným růstem kořene

Médium C1

U šesti vzorků nedošlo oproti minulému měření ke změně, rostliny jsou zelené, kořeny nerostou. U dvou explantátů prorůstá vícero kořenů o délce cca 3 mm. Rostliny jsou zelené a nadzemní část roste. U šesti explantátů došlo k drobnému přírůstku kořenů oproti minulému měření. U jednoho vzorku došlo k výraznému růstu rozvětvených kořenů o délce cca 7 mm.



Obr. 9 Explantát na médiu C1 s patrným růstem kořenů

Médium C2

U devíti rostlin se netvoří kořeny. U dvou rostlin došlo k mírnému přírůstku kořenů oproti minulému měření. U čtyř explantátů došlo k výraznému růstu kořenů, které se větví, délka kořenů je cca 3-3,5 cm. Rostliny, které zakořenili, vykazovaly od začátku explantace také mohutný růst nadzemní části.



Obr.10 Explantáty na médiu C2 s mohutným růstem kořenů

Médium C3

U tohoto média nedochází u explantátu k růstu kořenů ani nadzemní části, rostliny jsou zakrslé a v místě styku s médiem černají. Jedna rostlina je vitální, roste jak kořen, tak nadzemní část.

4.4.5 3.Měření

Kontrola po 39 dnech

Médium C0

U média C0 se po 39 dnech objevila u jednoho explantátu infekce. U pěti rostlin nedošlo k proliferaci kořenů. U jednoho explantátu jsou kořeny cca 3,5 cm dlouhé a rozvětvené. Dva explantáty mají cca 1,5 cm dlouhé nerozvětvené kořeny. U čtyř explantátů dochází k postupné proliferaci kořenů cca 3-4 mm.

Médium C1

U pěti explantátů nedošlo od posledního měření k žádnému přírůstku kořenů, kořeny nerostou, rostliny jsou malé se žlutozelenými listy, které se svinují směrem dovnitř. U čtyř rostlin byly kořeny stejné jako při předešlém měření, nicméně rostliny zvětšili nadzemní část, jsou zelené a vitální. U dalších pěti explantátů došlo k výraznému růstu kořenů, které jsou silné a větví se. Délka kořenů dosáhla cca 1,4-2 cm. Poslední z 15 explantátů měl rozvětvené kořeny o délce cca 2,2 cm. Nadzemní část rostliny byla výrazně vyšší než ostatní explantáty na tomto médiu.



Obr.10 Explantáty na médiu C1, které nevytváří kořeny



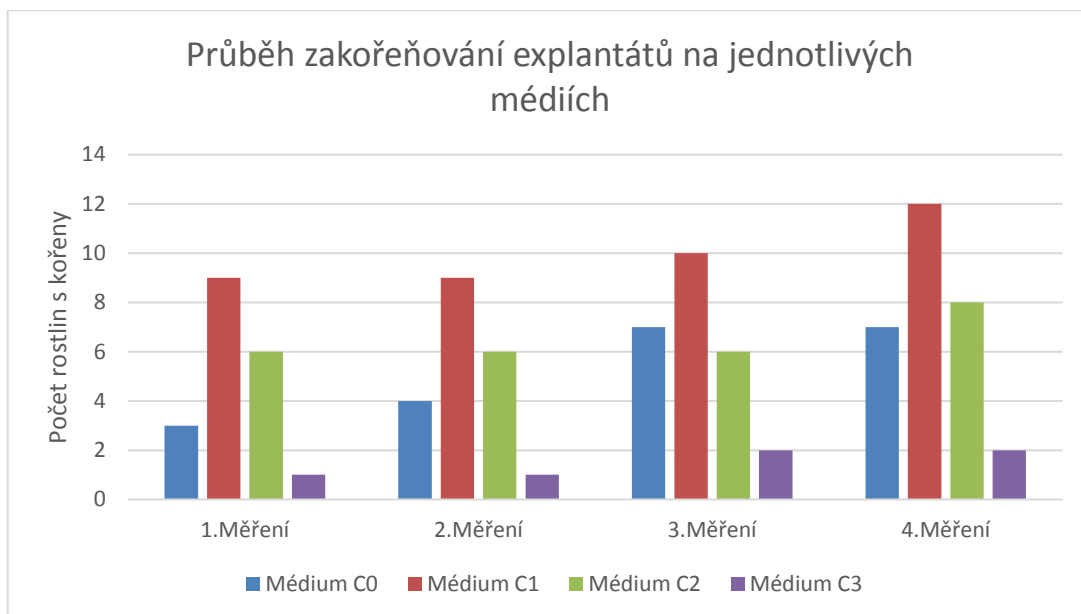
Obr.11 Explantáty na médiu C1 s výrazným růstem kořenů

Médium C2

U devíti rostlin nedošlo od posledního měření ke změně, rostliny netvoří kořeny, jsou zakrslé, listy se svinují směrem dovnitř. U dvou explantátů došlo k přírůstku kořenů cca o 4 mm. Čtyři explantáty mají silné rozvětvené kořeny, nadzemní část rostliny bujně roste.

Médium C3

U deseti rostlin nejsou patrné žádné změny, rostliny mají svinuté listy, jsou zakrslé a v místě kontaktu s médiem černají. U jednoho explantátu je teprve po 39 dnech patrná proliferace kořene o délce cca 2 mm. Na posledním explantátu je patrných pět kořenů.



Graf 1: Průběh zakořeňování explantátů na jednotlivých médiích

Z grafu je patrné že největší úspěšnost při zakořeňování mělo médium C1 s obsahem 0,15 NAA a 0,15 IAA, na kterém tvořilo nejvíce rostlin kořeny již od počátku explantace. Při měření po 39 dnech byl zaznamenán růst kořenů u dalších dvou explantátů. Při posledním měření po 45 dnech kultivace byla zaznamenána proliferace kořene u jednoho dalšího explantátu. Kultivační médium C2 s obsahem 0,15 NAA vykazovalo konstantní počet zakořeňujících rostlin po celou dobu explantace. Rovněž u tohoto média bylo při posledním měření zjištěna proliferace kořene u jednoho dalšího explantátu. Jako nejhorší kultivační médium bylo vyhodnoceno médium C3 s obsahem 0,15 IAA, z celkového počtu 15 rostlin zakořenily pouze dvě. Ostatní nejevily po celou dobu explantace známky proliferace kořenů.

5 VÝSLEDKY A HODNOCENÍ

Po 45 dnech byly explantáty vyjmuty ze zkumavek, aby bylo možné přesně zhodnotit počet a rozměry kořenů. Každé médium je hodnoceno samostatně. Hodnocen je počet rostlin, které v médiu zakořenili, množství, rozměry kořenů a vitalita rostlin.

5.1 Médium C0

Na médiu C0 bez přidaných regulátorů rostlinného růstu zakořenilo 46,6 % rostlin. Kořeny dosáhly délky v rozmezí 4 mm-4,5 cm. Delší kořeny byly poměrně tenké a křehké. Rostliny, které zakořenily byly celkově vitální.



Obr. 12 Explantáty vyjmuté z média C0



Obr. 13 Explantáty vyjmuté z média C0



Obr. 14 Explantáty vyjmuté z média C0

5.2 Médium C1

Médium C1 s obsahem 0,15 NAA a 0,15 IAA bylo zhodnoceno jako nejlepší co se týče počtu zakořeněných rostlin mezi ostatními použitými médii. Z celkového počtu patnácti rostlin jich zakořenilo dvanáct, tedy 80 %. Rostliny dobře zakořeňovaly již od začátku explantace. Nárůst kořenů při měření po 11 dnech byl cca 3 mm, kořeny dosáhly po 45 dnech délky 4 mm-4,0 cm, byly silné a dále se větvaly. Na delších kořenech vyrůstalo jemné kořenové vlášení. Rostliny byly celkově vitální, bez žloutnutí listů.



Obr. 15 Explantáty vyjmuté z média C1



Obr. 16 Explantáty vyjmuté z média C1



Obr. 17 Explantáty vyjmuté z média C1

5.3 Médium C2

Médium C2 s obsahem 0,15 NAA mělo po celou dobu explantace konstantní počet kořenících explantátů. Z celkového počtu patnácti explantátů jich zakořenilo osm, tedy 53,3 %. Počet rostlin je sice menší než u média C1 s obsahem 0,15 NAA a 0,15 IAA, kořeny však dosáhly délky 3-4,3 cm. Každý kořenící explantát měl 4-8 kořenů které se dále větvily. Oproti médiu C1 byly kořeny u média C2 silnější, delší a s větším počtem drobného kořenového vlášení. Koncentrace kyseliny naftyloctové spolu s kyselinou indolyl-3-octovou pozitivně ovlivňovala regeneraci rostlin v médiu, růst kořenů i nadzemní části rostlin.



Obr. 18 Explantáty vyjmuté z média C2



Obr. 19 Explantát vyjmutý z média C2



Obr. 20 Explantáty vyjmuté z média C2

5.4 Médium C3

Kultivační médium C3 s obsahem 0,15 IAA bylo zhodnoceno jako nejméně vhodné pro zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro* v porovnání s ostatními použitými médii. Rostliny na médiu celkově neprosplávaly, netvořily kořeny, byly malé, listy postupně žloutly a rostliny odumíraly. Z celkového počtu patnácti rostlin zakořenily pouze dvě, tedy 13,3 %. U jednoho explantátu došlo k proliferaci dvou velmi malých kořenů (4 mm), druhý explantát zakořenil velmi dobře (3,6 cm) kořeny byly silné a rostlina byla celkově vitální.



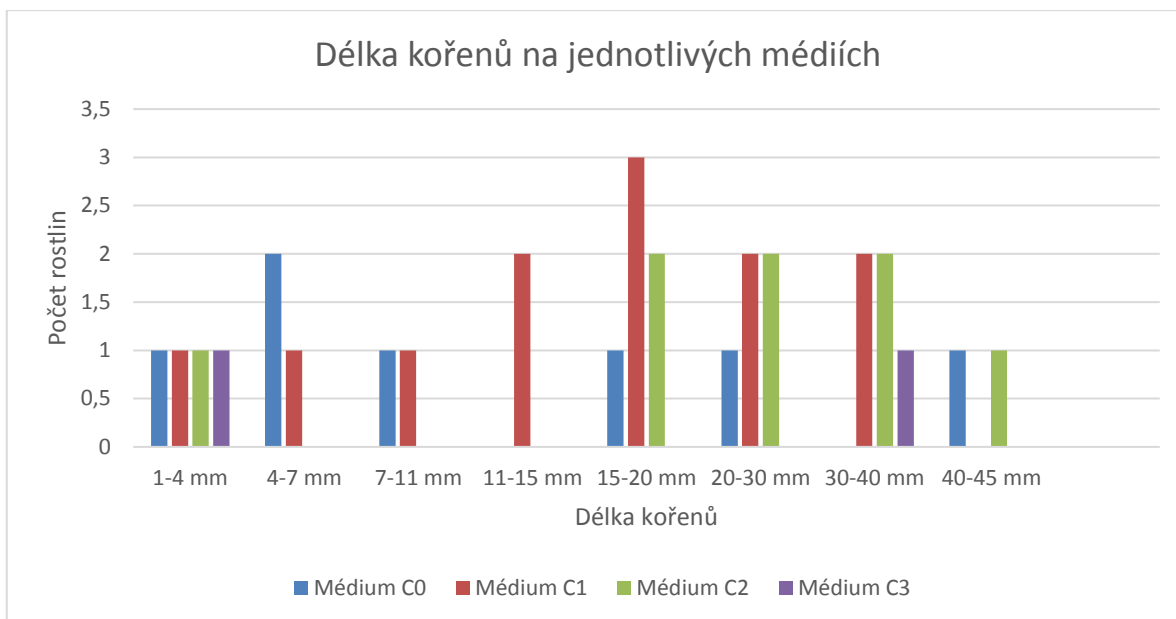
Obr. 21 Explantáty vyjmuté z média C3



Obr. 22 Explantáty vyjmuté z média C3

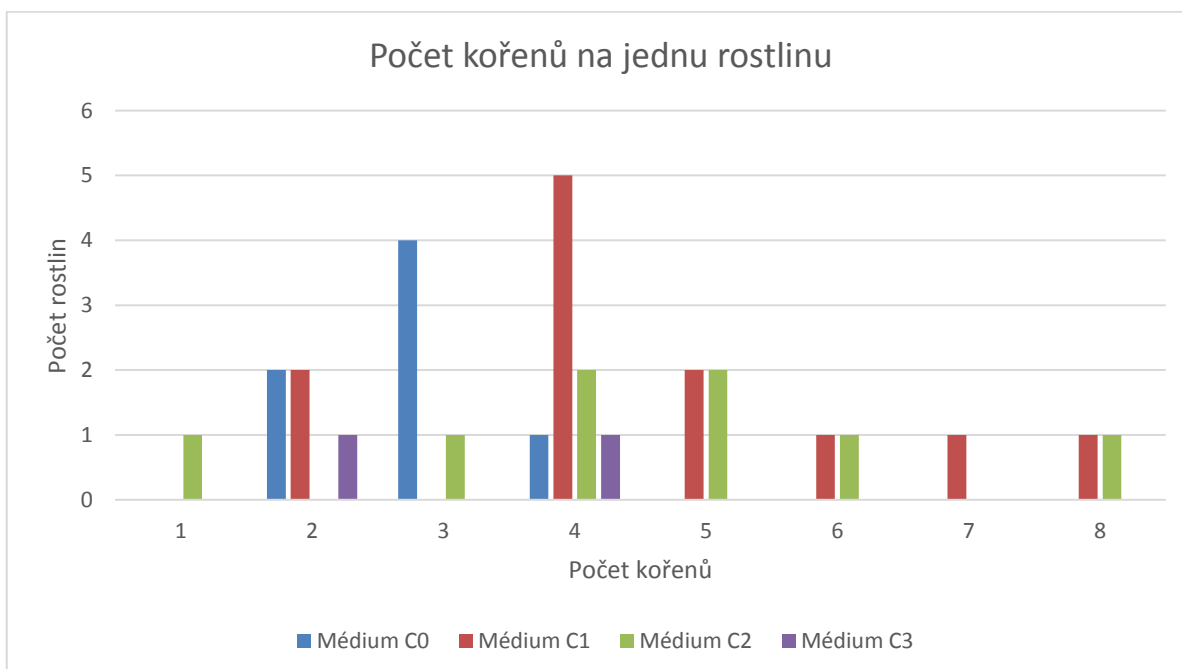


Obr. 23 Explantáty vyjmuté z média C3



Graf 2: Délka kořenů na rostlinu na jednotlivých médiích

Na grafu je znázorněn počet zakořeňujících rostlin na jednotlivých médiích a délka kořenů každého explantátu. Je jasně vidět, že co se týče délky kořenů, byly výsledky nejlepší na médiích C1 a C2.



Graf 3: Počet kořenů na rostlinu na jednotlivých médiích

Na grafu je znázorněn počet kořenů na každém explantátu na rozdílných médiích. Nejlepší výsledky opět vykazuje médium C1 a Médium C2 s nejvyšším počtem kořenů.

6 DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřena na zakořeňování *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro*. *In vitro* kultivace rostlinných explantátů je ovlivněna mnoha faktory, jako například složením kultivačního média, typu explantátu nebo genotypu. Každý rostlinný druh a každý regulátor růstu, pokud jde o zakořeňování, mají své specifické vlastnosti a schopnosti. Dle Auduse (1963) podněcují zakořeňování auxinoidy IAA, IBA, NAA, kyselina 2-chlorfenoxypionová a další. Všechny uvedené auxinoidy jsou velmi účinné, musí se však dodržovat správná koncentrace, jinak jsou toxické, zabrzdí růst a rostliny uhynou (Kutina, 1977). Při multiplikaci révy vinné v podmínkách *in vitro* lze použít různé části rostlin. Pro založení primárních kultur byly v této práci použity jednodálí segmenty čtyř podnožových odrůd révy vinné (CR2, Kober 5BB, Kober 125AA a SO4). Největší úspěšnost multiplikace vykazovala odrůda CR2 a byla proto použita k další práci.

Singh a kol., (2004) provedli pokus s multiplikací révy vinné na médiu MS obohaceném o BA (2,0 a 4,0 mg.l⁻¹) a NAA (2,0 mg.l⁻¹). V médiu BA (2,0 mg.l⁻¹) s přidaným IBA (2,0 mg.l⁻¹) a aktivním uhlím (200 mg.l⁻¹) docházelo k nejlepšímu růstu výhonků i kořene. Účinky NAA se projevovaly méně. V mém pokusu však docházelo u média C2 (které obsahovalo pouze NAA 0,15 mg.l⁻¹) k výraznému růstu kořenů i nadzemní části rostlin. Absence regulátorů rostlinného růstu BA a IBA tedy explantáty negativně neovlivnila. Naopak nižší koncentrace NAA, než uvádí Singh a kol. (2004) měla pozitivní vliv na růst rostlin.

Kurmi a kol. (2011) zkoumali účinky různých auxinů v různých koncentracích na výhoncích révy vinné získaných z kultury jednodálí segmentů odrůdy Thompson Seedless a Karnet. Na médiu obohaceném o kyselinu naftyloctovou s koncentrací NAA 0,5 mg.l⁻¹, byla úspěšnost zakořeňování 75 %, rostliny tvořily průměrně 3,2 kořenů a délka kořenů byla 4,07 cm. Na médiu s 0,1 mg.l⁻¹ byla úspěšnost rhizogeneze 70 %, explantáty tvořili průměrně 3 kořeny a průměrná délka byla 3,90 cm. U média C2 s obsahem 0,15 mg.l⁻¹ NAA byla úspěšnost rhizogeneze 53 %, průměrný počet kořenů na rostlinu byl 3,1 a délka kořenů 3,4 cm. Srovnání výsledků ukazuje, že i velmi malé snížení koncentrace NAA působilo na explantáty negativně.

Zhang et al. (2006) zkoumali účinek IAA, NAA a IBA na zakořeňování výhonků *Vitis piasezkii*. Z koncentrací 0,1 mg.l⁻¹, 0,2 mg.l⁻¹, 0,5 mg.l⁻¹ a 1,0 mg.l⁻¹ IAA zakořeňovaly rostliny nejlépe na médiu s koncentrací 0,2 mg.l⁻¹ IAA s 44 % úspěšností a na médiu s 0,1 mg.l⁻¹ s 34 % úspěšností zakořeňování. Při stejných koncentracích vyhodnotili jako nejlepší médium obohacené o NAA médium s 0,5 mg.l⁻¹ s úspěšností 38 % a médium s NAA 0,2 mg.l⁻¹ s 30 % úspěšností zakořeňování. Počet kořenících rostlin, délka kořenů a počet kořenů na explantát klesal, pokud byly koncentrace nižší nebo vyšší než výše uvedené. V mém pokusu jsem dosáhla lepších výsledků na médiu C2 s obsahem 0,15 mg.l⁻¹ NAA, kde byla úspěšnost zakořeňování 53 %. Naopak při snížení koncentrace IAA oproti nejlepšímu výsledku, kterého dosáhli Zhang et al. (2006) s koncentrací 0,2 mg.l⁻¹ IAA, byla úspěšnost zakořeňování pouze 13 %. Dle Alizadeh a kol. (2010) je účinek rostlinných hormonů značně variabilní v závislosti na jejich koncentraci a použití. Koncentrace účinná na jeden druh nebo odrůdu nemusí být stejně účinná pro jiný druh či kultivar. To potvrzuje studie Roubelakis-Angelakis (1991), ve které byly zkoumány účinky regulátorů rostlinného růstu na zakořeňování u patnácti genotypů révy vinné. Při aplikaci stejného hormonu do média se výsledky různých genotypů výrazně lišily. Z výzkumu vyplývá, že reakce explantátů na obsah regulátorů rostlinného růstu v médiu je silně genotypově závislá. Získané výsledky diplomové práce ukazují, že pro zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro*, konkrétně podnožové odrůdy CR2, je nejvhodnější kultivační médium s kombinací kyseliny naftyloctové (0,15 mg.l⁻¹) a kyseliny indolyloctové (0,15 mg.l⁻¹). Na tomto médiu zakořeňovalo 80 % explantátů.

7 ZÁVĚR

Pěstování révy vinné je rozšířeno téměř po celém světě a v posledních letech zažívá vinohradnictví výrazný rozmach. Každým rokem je ve světě zakládáno mnoho nových vinic se spotřebou několika milionů sazenic révy vinné. Velmi vhodným řešením pro uspokojení poptávky po takovém množství rostlinného materiálu je metoda množení *in vitro*. Metody množení *in vitro* umožňují získat velký počet rostlinného materiálu při minimálním požadavku na prostor, je možné získat zcela bezvirozní materiál a šlechtit nové odrůdy révy vinné.

V diplomové práci na téma zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro* byly k založení primární kultury použity čtyři podnožové odrůdy (CR2, Kober 5BB, Kober 125 AA a SO4). Jednodálňní segmenty těchto podnoží byly kultivovány na MS médiu s přidavkem sacharózy, myoinositolu ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a regulátory rostlinného růstu BA ($0,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Nejvyšší úspěšnost při kultivaci vykazovala podnožová odrůda CR2 a byla proto vybrána k další části pokusu, tedy vlastnímu zakořeňování v podmínkách *in vitro*. Tato odrůda byla následně multiplikována na čtyřech variantách MS média s přidavkem regulátorů rostlinného růstu. MS médium s označením C0 sloužilo jako kontrolní a nebyly do něj přidány regulátory rostlinného růstu. MS médium obohacené o $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA a $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA bylo označeno jako C1, MS médium obohacené o $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA bylo označeno jako C2 a MS médium obohacené o $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA bylo označeno jako C3. Explantáty byly pravidelně kontrolovány a byla sledována celková vitalita rostlin a přírůstek kořenů, jejich délka a množství.

Z naměřených výsledků vyplývá, že pro zakořeňování bylo nejvhodnější médium C1 obohacené o regulátory rostlinného růstu $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA a $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA. Úspěšnost zakořenění byla 80 %. Rostliny tvořily dlouhé silné kořeny s množstvím drobného kořenového vlášení. Přítomnost kyseliny naftyloctové a kyseliny indolyl-3-octové pozitivně působila jak na růst kořenů, tak na růst nadzemní části rostlin. Jako nejméně vhodné médium bylo vyhodnoceno médium C3 obohacené o $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA. Na tomto médiu zakořenilo pouze 13,3 % rostlin. U zbylých rostlin byl inhibován růst, rostliny žloutly a stonky v místě kontaktu s médiem nekrotizovaly.

U média C0 bez přidaných regulátorů rostlinného růstu podporujících zakořeňování došlo k překvapivě pozitivním výsledkům. K rhizogenezi došlo u 46,6 % explantátů, což je výsledek srovnatelný s médiem C2 s přídavkem 0,15 mg.l⁻¹ NAA, kde byla úspěšnost zakořeňování 53,3 %. Možným vysvětlením je působení složek živného média, na kterém probíhala předchozí kultivace primární kultury. Především vliv rostlinných hormonů může značně modifikovat postup při následném zakořeňování. V některých případech explantát lépe zakoření při úplné absenci rostlinných hormonů v důsledku dostatečného množství endogenních auxinů, které stimulují iniciaci a růst kořene.

8 SOUHRN, RESUME A KLÍČOVÁ SLOVA

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se složení médií pro zakořeňování *Vitis vinifera* v podmínkách *in vitro* a s ohledem na získané informace navrhnout složení několika zakořeňovacích médií. Média obsahovala rozdílné koncentrace kyseliny indolyloctové a kyseliny naftyloctové. Explantáty na jednotlivých médiích byly průběžně hodnoceny. Po 45 dnech byly explantáty vyjmuty ze zkumavek a byla hodnocena celková úspěšnost rhizogeneze na daném médiu, délka a počet kořenů. Jako nejvhodnější z testovaných médií bylo vyhodnoceno médium C1 s obsahem 0,15 mg.l⁻¹ kyseliny indolyloctové a 0,15 mg.l⁻¹ kyseliny naftyloctové. Kultivace probíhala v laboratoři Mendelovy zahradnické fakulty v lednici.

Klíčová slova: *Vitis vinifera*, *in vitro*, rhizogeneze, zakořeňování, regulátory rostlinného růstu

Resume

The aim of this master thesis was to process literary research related to rhizogenesis of *Vitis vinifera in vitro* and suggest composition of rooting media with regard to gathered informations. The media contained varying concentrations of indolylacetic acid and naphthylacetic acid. Explants on individual media were continuously evaluated. After 45 days, the explants were removed from the tubes and the overall success rate of rhizogenesis on the medium, the length and the number of roots were evaluated. The most suitable of the media to be tested was a medium containing 0.15 mg.l⁻¹ indolylacetic acid and 0.15 mg.l⁻¹ naphthylacetic acid. Cultivation took place at the Mendel Garden Faculty's laboratory in Lednice.

Key words: *Vitis vinifera*, *in vitro*, rhizogenesis, rooting, plant hormones

9 POUŽITÁ LITERATURA

- ALIZADEH M., SINGH S. K., PATEL V. B. (2010): „*Comparative performance of in vitro multiplication in four grape (Vitis spp.) rootstock genotypes.*“ International Journal of Plant Production 4 (1): 41-50. 1735-6814.
- AUDUS, L.J.: Plant growth substances. Plant science monographs. London, New York, 1963.
- BAJAJ, Y. P. S. (1986): Biotechnology in agriculture and forestry. 1986
- BAUER, K. (1939): Uber Explantation in vitro. Ergebnisse Biol. 16:336-512.
- BEYL, Caula A. a R. N. TRIGIANO. *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Second edition. CRC Press, 2016. ISBN 9781466503878.
- BLANKENSHIP, Sylvia. Ethylene: The Ripening Hormone. *16th Annual Postharvest Conference* [online]. Yakima, WA, 2000 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pages/PC2000F>
- COFFIN, Robert, C. D. TAPER a Calvin CHONG. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. *Canadian Journal of Botany* [online]. 1976, **54**(7), 547-551 [cit. 2016-12-30]. DOI: 10.1139/b76-054. ISSN 0008-4026. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b76-054>
- DAVIERE, J.-M. a P. ACHARD. Gibberellin signaling in plants. *Development* [online]. 2013, **140**(6), 1147-1151 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1242/dev.087650. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.087650>
- ED. H.P. SHARMA. *Plant Tissue Culture: Totipotency to Transgenic*. Jodhpur: Agrobios, 2012. ISBN 9788177544671. Chapter: 3, Publisher: Agrobios (India), Editors: HP Sharma, JVV Dogra, AN Misra, pp.31-42

Dostupné

z:

https://www.researchgate.net/publication/235926460_Sterilisation_techniques_in_plant_tissue_culture

EDWIN F. GEORGE, MICHAEL A. HALL, GEERT-JAN DE KLERK, EDITORS.
VOL. 1 a The BACKGROUND. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2007. ISBN 9781402050046.

GALET, P. (2000): Dictionnaire encyclopédique des cépages. Paris: Hachette Pratique. ISBN 9782012363311.

GRENAN, S. (1989): Micropropagation of Grapevine (*Vitis vinifera*), Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 18, 379-394

HRADILÍK, J. (2005): *Rostlinné explnatáty*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005, 85s. ISBN 80-7157-915-7.

KINCL, Miloslav a Václav KRPEŠ. *Základy fyziologie rostlin*. 2. dopl. vyd. Ostrava: Montanex, 2000. ISBN 80-7225-041-8.

KRAUS V. (2012): *Pěstujeme révu vinnou*. 2., aktualizované a rozšířené vydání Praha: Grada, 111 s. ISBN 978-80-247-3465-1.

KRAUS, V., HUBÁČEK V., ACKERMANN P. (2000): *Rukověť vinaře*. Vyd. 1. Praha: Brázda, 262 s., [12] s. barev. Obr. příl. ISBN 80-853-6234-1.

KUTINA, Josef. *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1977. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).

Kurmi, U.S, Sharma, D.K., Tripathi, M.K. a Tiwari, R. Plant regeneration of *Vitis vinifera* (L) via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments. *Journal of Agricultural Technology* [online]. 2011, **2011**(7), 721-737 [cit. 2017-03-25]. ISSN 1686-

9141. Dostupné z: http://ijat-aatsea.com/pdf/May_v7_n3_11/16%20IJAT2010_108F-R.pdf

LAMBERS, H. a Timothy D. COLMER. *Root physiology: from gene to function*. Boston: Springer, c2005. Kluwer handbook series of plant ecophysiology, v. 4. ISBN 9781402040986.

LAZO-JAVALERA, M. F., R. TRONCOSO-ROJAS, M. E. TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. A. MARTÍNEZ-TELLEZ, I. VARGAS-ARISPURO, M. A. ISLAS-OSUNA a M. RIVERA-DOMÍNGUEZ. Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus* [online]. 2016, **5**(1), - [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1186/s40064-016-2081-0. ISSN 2193-1801. Dostupné z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2081-0>

MACHÁKOVÁ, I. (1998): Růst a vývoj: Růstové regulátory, v: PROCHÁZKA, S. a kol.: Fyziologie rostlin. Praha Academia. Kap. 8, s. 226-284. ISBN 80-200-0586-2

MOK, Machteld C., Ruth C. MARTIN a David W. S. MOK. Cytokinins: Biosynthesis metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* [online]. 2000, **36**(2), 102-107 [cit. 2016-10-03]. DOI: 10.1007/s11627-000-0021-7. ISSN 1054-5476. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11627-000-0021-7>

MORLAT, R.; JACQUET, A. The soil effects on the grapevine root system in several vineyards of the Loire valley (France). *Vitis*, v.32, p.35-42, 1993.

NOVÁK, F., J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. 1. vyd. Praha: Academia, 208 s. ISBN 80-200-0344-4.

PAP, Dániel, Summaira RIAZ, Ian B. DRY, Angelica JERMAKOW, Alan C. TENSCHER, Dario CANTU, Róbert OLÁH a M. Andrew WALKER. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, Ren6 and Ren7, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biology* [online]. 2016, **16**(1), - [cit. 2017-05-03].

DOI: 10.1186/s12870-016-0855-8. ISSN 1471-2229. Dostupné z:
<http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-016-0855-8>

PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.

PAVLOUŠEK, Pavel. *Vinohradnictví - odrůdy révy vinné*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. ISBN 80-7157-415-5.

PLANCHON, J. E. (1887): *Monographie des Ampélideae vraies*. Monographia Phanerogamerum, 5: 305-364.

PROCHÁZKA S., HUBÁČEK V., ACKERMANN P. (1998): *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Ilustrace Marie Suchardová, Pavel Dvorský, Gašpar Vanek. Praha: Academia, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.

PROCHÁZKA S., ŠEBÁNEK J. (1997): *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 395 s. ISBN 80-200-0597-8.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS. A New Culture Medium for in Vitro Rhizogenesis of Grapevine (*Vitis* spp.) Genotypes. *Hort Science* [online]. 1991, (26), 1551-1553 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/261960865_A_New_Culture_Medium_for_in_Vitro_Rhizogenesis_of_Grapevine_Vitis_spp_Genotypes

SAKAKIBARA, Hitoshi. CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2006, **57**(1), 431-449 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231. ISSN 1543-5008. Dostupné z:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>

SEDLO, J. (1994): *Ekologické vinohradnictví*, ministerstvo zemědělství České republiky Agrospoj Praha, ISBN 80-7084-117-6

SINGH, S., K., KHAWALE, R., N., SINGH, S., P. (2004): *Technique for rapid in vitro multiplication of Vitis vinifera L. cultivars*, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 79:2, 267-272

ŠEBÁNEK, J., SLADKÝ, Z. (1988): *Biotechnologie rostlinných explantátů*, VŠZ Brno, 19-100

TRIGIANO, R. N. a Dennis J. GRAY. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. ISBN 9781420083262.

TRIGIANO, R. N. a Dennis J. GRAY. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2000. ISBN 0849320291.

TORREY, J G. Root Hormones and Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology* , 1976, ISSN 0066-4294

WAYNE F. WILCOX, Walter D. Gubler, and Jerry K. Uyemoto *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, Second Edition*, page 1-16
ISBN 978-0-89054-481-5

ZHANG, Jin Lin, Rui XU, Zi Yi CAO, Suo Min WANG a Ji Zhou REN. Factors affecting in vitro propagation of a Chinese wild grape (*Vitis piasezkii* var. *pagnucii*): Shoot production and rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* [online]. 2006, **34**(3), 217-223 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1080/01140671.2006.9514410. ISSN 0114-0671. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01140671.2006.9514410>