

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



**Indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté
(*Phlox paniculata*) v podmínkách *in-vitro***

Bakalářská práce

Autor práce: Ondřej Šašek

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

© 2014/2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in-vitro*" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne **12.04.2015**

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Pavlovi Matiskovi, Ph.D. za cenné rady a vedení v průběhu práce.

Indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in-vitro*

Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*) je významná trvalka velice často pěstovaná v zahradách a parcích. Množení somatickou embryogenezí má u ní význam primárně ze šlechtitelského hlediska, kdy je využíváno genetické stability získaných rostlin a zároveň výhod kultivace *in-vitro*. V této práci byla zkoumána možnost indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté s cílem stanovit nejvhodnější kombinaci regulátorů rostlinného růstu produkující nejvíce somatických embryí. Jako explantáty byly zvoleny listové segmenty velikosti zhruba 1 cm² a kultivace probíhala na živném médiu Murashige and Skoog (1962) se 3 % sacharózy, 0,5 mg.l⁻¹ thiaminu, 0,5 mg.l⁻¹ pyridoxinu, 0,05 mg.l⁻¹ kyseliny nikotinové, 100 mg.l⁻¹ inositolu a 2 mg.l⁻¹ glycinu (MS médium). Byl testován účinek auxinů 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová), IAA (kyselina indolyl-3-octová) a cytokininu BAP (6-benzylaminopurin) na indukci somatické embryogeneze. Nejlepších výsledků z pohledu tvorby embryogenního kalusu a nejvyššího počtu získaných životných embryí bylo dosaženo u variant obsahujících 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ a 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹. Indukce tvorby embryogenního kalusu proběhla u 100 % explantátů v případě první varianty a u 94,94 % při použití druhé. Mezi výše zmíněnými variantami nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v získaném množství embryí. Rovněž bylo prokázáno, že pro indukci a průběh somatické embryogeneze je nutná kultivace explantátů v plně kontrolovaných podmínkách inkubátoru. Dozrávání a klíčení somatických embryí probíhalo na MS médiu poloviční koncentrace živin se 2 % sacharózy, v tomto pokusu bylo prokázáno, že somatická embrya musí být pro další vývoj kultivována odděleně. Nejlepší klíčivost embryí byla dosažena při použití varianty 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹. Převodem klíčících embryí do substrátu bylo dokázáno, že rostlinky se uchyťí, až když mají vyvinuté kořeny i základy prýtu a listů. Klíčivost embryí byla u varianty 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ 2,35krát větší po 3 týdnech a 1,96krát větší po 8 týdnech oproti 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ a díky tomu z ní bylo získáno 1,83krát větší množství převedených rostlin.

Klíčová slova:

plamenka latnatá (*Phlox paniculata*), somatická embryogeneze, regulátory rostlinného růstu, auxiny, cytokininy, kultury *in-vitro*

Induction of somatic embryogenesis in garden phlox (*Phlox paniculata*) in condition *in-vitro*

The garden phlox (*Phlox paniculata*) is an important perennial plant, usually grown in gardens and public parks. From a point of view of plant breeding, the somatic embryogenesis propagation is a significant process in which the advantage of the genetic stability of the acquired plants is taken as well as the advantages of the *in-vitro* cultivation. This thesis investigated the possibility of the induction of somatic embryogenesis in garden phlox with the goal to set the most suitable combination of the plant growth regulators producing the highest number of somatic embryos. The leaf segments measuring 1 cm² were chosen as the explants and the cultivation took place on Murashige and Skoog medium (1962) + 3 % sucrose, thiamine 0,5 mg. l⁻¹, pyridoxine 0,5 mg. l⁻¹, nicotinic acid 0,05 mg. l⁻¹, inositol 100 mg. l⁻¹ and glycine 2 mg. l⁻¹ (MS medium). The effect of auxins 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), IAA (Indole-3-acetic acid) and cytokinin BAP (6-Benzylaminopurine) on the induction of somatic embryogenesis was tested. Combinations containing 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ and 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ were most effective in formation of the embryogenic callus and the highest number of the acquired vital embryos. The induction of formation of the embryogenic callus took place in 100 % of the explants while using the first variant and in 94,94 % of the explants while using the second one. While using these two variants there was no statistical evidence proving the difference in the number of developed somatic embryos. It was also proved that for the induction and the process of the somatic embryogenesis the cultivation of the explants in a incubator is necessary. Somatic embryo maturation and germination took place in half-strength MS medium containing 2 % sucrose without the growth regulators. This experiment proved that somatic embryos have to be cultivated separately for the further development. The most effective germination was obtained while using the combination of 2,4-D 2 mg. l⁻¹ and BAP 0,5 mg. l⁻¹. Transfer of the germinated embryos to substrate was successful when the plantlets had their roots and shoots well developed. The embryo germination was 2,35times higher after 3 weeks and 1,96times higher after 8 weeks while using the variant 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ than while using the variant 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ and thus the variant 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ produced 1,83times more transferred plants.

Keywords:

Garden phlox (*Phlox paniculata*), Somatic embryogenesis, Plant growth regulators, Auxins, Cytokinins, Condition *in-vitro*

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	2
3. Literární rešerše	3
3.1. Plamenka latnatá (<i>Phlox paniculata</i>)	3
3.1.1. Biologická klasifikace.....	3
3.1.2. Popis rodu plamenka (<i>Phlox</i>).....	3
3.1.3. Popis druhu plamenka latnatá (<i>Phlox paniculata</i>) a její kultivace	3
3.1.3.1. Péče, stanoviště.....	4
3.1.3.2. Škůdci, choroby	4
3.1.3.3. Množení.....	5
3.1.3.4. Kultivar 'Mt. Fuji'	5
3.2. Kultury <i>in-vitro</i>	6
3.2.1. Teorie explantátových kultur	6
3.2.2. Pracovní podmínky, vybavení	6
3.2.2.1. Autokláv	7
3.2.2.2. Aseptický box (laminární box, flowbox).....	7
3.2.3. Kultivační podmínky	7
3.2.3.1. Fyzikální podmínky kultivace	8
3.2.4. Kultivační média.....	9
3.2.4.1. MS médium	10
3.3. Fytohormony, regulátory rostlinného růstu.....	10
3.3.1. Charakteristika látek regulujících růst rostlin.....	10
3.3.2. Klasifikace regulátorů rostlinného růstu používaných v explantátových kulturách	12
3.3.2.1. Auxiny	12
3.3.2.2. Cytokininy	13

3.3.2.3.	Gibereliny	14
3.3.2.4.	Kyselina abscisová	15
3.4.	Vývoj explantátů v podmínkách <i>in-vitro</i>	15
3.4.1.	Regenerace přímá a nepřímá.....	15
3.4.2.	Způsoby regenerace	16
3.4.2.1.	Organogeneze	16
3.4.2.2.	Embryogeneze	17
3.4.3.	Somatická embryogeneze	20
3.4.3.1.	Příklady.....	21
3.4.3.2.	Plamenka latnatá (<i>Phlox paniculata</i>).....	23
3.4.4.	Fáze mikropropagace	23
3.4.4.1.	Stádium 0 - výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátů ...	23
3.4.4.2.	Stádium 1 - odvození aseptické kultury	24
3.4.4.3.	Stádium 2 - fáze růstu explantátové kultury.....	24
3.4.4.4.	Stádium 3 - zakořeňování <i>in-vitro</i>	24
3.4.4.5.	Stádium 4 - zakořeňování <i>in-vivo</i>	25
4.	Metodika	25
4.1.	Vybavení, pracovní a kultivační podmínky	25
4.2.	Média a regulátory rostlinného růstu	26
4.2.1.	Příprava MS média	26
4.2.2.	Použité varianty	28
4.3.	Odběr a ošetření explantátů.....	28
4.3.1.	Použití rostlinného materiálu získaného organogenezí <i>in-vitro</i>	29
4.4.	Založení a průběh pokusů	29
4.4.1.	Pokus č.1	30
4.4.2.	Pokus č.2.....	31
4.4.3.	Pokus č.3	32

4.4.4.	Převod somatických embryí do substrátu	32
4.5.	Metodika zpracování výsledků	33
5.	Výsledky	33
5.1.	Výsledky jednotlivých variant a postupů	33
5.1.1.	Desinfekce explantátů	33
5.1.2.	Pokus č.1	33
5.1.3.	Pokus č.2	36
5.1.4.	Pokus č.3	40
5.1.5.	Převod somatických embryí do substrátu	45
6.	Diskuse	48
7.	Závěr	52
8.	Seznam literatury	53
9.	Seznam použitých zkratk	56

1. Úvod

Phlox paniculata (Plamenka latnatá) je vytrvalá rostlina náležící do čeledi *Polemoniaceae* (jirnicovité). Pochází z východní a střední části USA, odkud byla introdukována do celého světa jako efektní kvetoucí rostlina pro pěstování v zahradách a parcích. V současné době existují stovky okrasných kultivarů, často mezidruhových kříženců, někdy označovaných jako *Phlox x hortorum*. Tyto zahradní odrůdy dávají při generativním rozmnožování nejednotné potomstvo a využití semen je u toho druhu tedy vhodné pouze pro účely šlechtění. Klasické metody vegetativního množení při kterých jsou odrůdové vlastnosti zachovány zahrnují u plamenky latnaté dělení trsů, stonkové a kořenové řízky. Množitelský koeficient je ale nízký a pro uspokojivou produkci nejsou příliš vhodné.

Využití explantátových kultur umožňuje vypěstování velmi velkého množství rostlin na malé ploše a bez ohledu na roční období. Kultivace *in-vitro* umožňuje vývoj dvěma hlavními způsoby - organogenezí a somatickou embryogenezí.

Somatická embryogeneze představuje metodu klonového množení rostlin na základě somatických embryí, tedy embryí vzniklých z jiných buněk než je zygota. V podmínkách *in-vitro* lze stimulovat působením regulátorů rostlinného růstu jejich tvorbu z celé řady typů explantátů, například listů, kořenů, děloh, okvětních lístků, atd. Takto vzniklá embrya mohou ve vhodných podmínkách vyklíčit v celistvé rostliny. Somatická embryogeneze může probíhat buď přímo bez kalusového stádia, což není tak časté, nebo nepřímo přes stádium neorganizovaného kalusu. V praxi je využívána u mnoha druhů pro vysoký výnos embryí a hlavně jejich genetickou stabilitu, široké uplatnění tedy nalézá primárně ve šlechtitelství.

2. Cíl práce

Cílem práce je experimentální určení nejvhodnější kombinace fytohormonů pro indukci somatické embryogeneze při množení plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách *in-vitro*.

Dále pak statisticky zpracovat výsledky, ohodnotit použitelnost této metody a získat finální rostliny schopné růstu v podmínkách *ex-vitro*.

3. Literární rešerše

3.1. Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*)

3.1.1. Biologická klasifikace

- Říše: *Plantae* (rostliny)
- Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)
- Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)
- Třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné)
- Řád: *Polemoniales* (jirnicotvaré)
- Čeleď: *Polemoniaceae* (jirnicovité)
- Rod: *Phlox* (plamenka)
- Druh: *Phlox paniculata* (plamenka latnatá)

(Novák a Skalický, 2012)

3.1.2. Popis rodu plamenka (*Phlox*)

Název má původ v řeckém slově phlox = plamen. Rostlina byla takto pojmenována pro zářivě červené květy původního druhu. Tento rod má více než 50 druhů jednoletých a vytrvalých bylin, pocházejících převážně ze Severní Ameriky. Zahradní vytrvalé plamenky lze rozdělit do dvou skupin: nízké, často s poléhavými lodyhami, kvetoucí časně na jaře, a vysoké, s přímými lodyhami, kvetoucí v létě a na podzim (Golovkin a kol., 1986).

3.1.3. Popis druhu plamenka latnatá (*Phlox paniculata*) a její kultivace

Phlox paniculata dorůstá výšky až 100cm, kvete od konce června do srpna. Květy původního druhu jsou karmínově červené, zahradní odrůdy, kterých je několik set, kvetou ve všech odstínech od bílé až do modrofialové.

Původní druh *Phlox paniculata* je domovem na východě USA, kde roste na loukách a v řídkých lužních hájích, na úrodných a vlhkých říčních náplavech. Rostliny mají tuhé, přímé, nevětvené stonky, olistěné po celé délce. Listy jsou vstřícné, přisedlé, podlouhle kopinaté, se síťovitou nervaturou. Květenstvím je bohatá vrcholová lata, často ještě zvětšená menšími latami, vyrůstajícími z paždí horních listů. Květy mají dlouhou trubku a plochý, široký lem s pěti zaoblenými nebo mírně vykrojenými cípy. Květ příjemně voní (Golovkin a kol.,1986).

Byla objevena v roce 1700, v roce 1732 se tato plamenka vydala na cestu do Evropy, nejdřív do Francie, kde se její kultury ujal zahradník Lierval a zároveň i známý šlechtitel P. L. V. Lemoine (1832-1911), jenž se rovněž věnoval zušlechťování této plaménky. Zlatou dobou šlechtění plamenky latnaté - *Phlox paniculata* (*Phlox x hortorum*), kdy bylo získáno nejvíce nejhodnotnějších odrůd, je prvních padesát let tohoto století (Böhms, 1991).

Pod názvem *Phlox paniculata* jsou uváděny četné zahradní formy a kultivary, vzniklé složitým mezidruhovým a meziodrůdovým křížením, kterým předal své znaky hlavně původní druh *P. paniculata*. Četné kulturní formy jsou mnohem větší než původní druhy. Dosahují výšky do 150cm i více, květy mají průměr přes 5 cm a jsou různých barev, čistých i smíšených tónů, často s odlišně zbarveným středem. Všechny nově vyšlechtěné kultivary stejně jako původní druh příjemně voní. Podle doby kvetení se zahradní plamenky dělí do tří skupin: rané - kvetou v první polovině června, střední - začínají kvést v druhé polovině července a pozdní - vykvétají v druhé polovině srpna (Golovkin a kol, 1986).

3.1.3.1. Péče, stanoviště

Pro zdárnou kulturu vyžadují plamenky pečlivě zpracovanou, háďátkem nezamořenou, přiměřeně vlhkou a živnou půdu. Za sucha jsou vděčné za dostatečnou zálivku (Böhms, 1991).

Hertle a kol. (2000) doporučují stanoviště na výsluní, převážně chladnější a před přílišnými větry chráněné. Půda by měla být čerstvá až vlhká, propustná, živinami bohatá, humózní.

3.1.3.2. Škůdci, choroby

Největším problémem pro plamenky je napadení háďátkem zhoubným. Typickými příznaky napadení jsou sklovitě oddělitelné stonky, deformované, odlišně zbarvené listy a žalostný stav rostliny. Zatím neexistují žádné ochranné prostředky, a tudíž je nutno

napadené rostliny ihned vyjmout z půdy a spálit. Na zamořených záhonech už nelze plamenky pěstovat (Böhm, 1991).

Dále pak mohou trpět houbovými chorobami, a to konkrétně padlím (Hertle a kol.,2000), septoriózou a verticilózou (Golovkin a kol.,1986).

3.1.3.3. Množení

Jelikož je žádoucí přenášet na potomstvo vlastnosti dané kulturní odrůdy, využívá se u zahradních plamének hlavně různých způsobů vegetativního rozmnožování. Množí se hlavně dělením silnějších trsů, ale též kořenovými a vrcholovými řízků na jaře, jakmile dosáhnou výhonky délky asi 20 cm (Böhm, 1991).

Tyto používané metody mají pouze malý množitelký koeficient, a proto je vhodný další výzkum na poli rozmnožování pomocí explantátových kultur, kde je dosahováno maximálních výnosů výpěstků. *In-vitro* techniky také nabízejí možnost ozdravení od viróz a zmíněných háďátek.

3.1.3.4. Kultivar 'Mt. Fuji'

'Mt. Fuji' je po řadu let populární kultivar. Je to vzpřímená, trs tvořící trvalka, typicky dorůstající výšky 3-4 stopy (pozn. 90-120 cm). Květy jsou aromatické, bílé, trubkovité, ploché, mají v průměru 1 palec (pozn. 2,54 cm) a jsou pětilaločné. Objevují se v létě ve velkých, terminálních, pyramidálních latách dlouhých až 15 palců (pozn. až 37 cm). Vzpřímené lodyhy jen málokdy potřebují oporu. Listy jsou úzké, vstřícné, kopinaté, dlouhé až 5 palců (pozn. 12,7 cm). Vhodná květina k řezu (Anonym, [cit. 2015-02-17]).

Pro tento kultivar se také někdy používají jména 'Fujiyama' nebo 'Mount Fujiyama'.

obr. 1 *Phlox paniculata* 'Mt. Fuji'



Zdroj: Anonym, [cit. 2015-02-17]

3.2. Kultury *in-vitro*

Obecně lze výhody a praktickou využitelnost těchto technik množení rostlin shrnout takto:

Mikromnožení je vhodné tehdy, jestliže se mají vyrobit zdravé rostliny při napadení porostu novými patogeny, nebo je-li normální množení pomalé a je možné jen v určitém období, nebo je-li rozmnožovací koeficient při normálním množení příliš malý a nebo není-li vegetativní množení obvyklými metodami vůbec možné, ve šlechtění dále k získání vysoce homozygotního materiálu a tím urychlení šlechtitelského procesu, ke zvýšení genetické variability výchozího materiálu, k překonání nekřížitelnosti některých druhů, ke zvýšení možnosti využití mutagenese a k uchování genetických zdrojů rostlin. První metoda využívá kalusové kultury somatických rostlinných pletiv, druhá meristémová pletiva vegetačních vrcholků a třetí izolované protoplasty nebo pylové buňky (vznik haploidních rostlin), popř. zárodky embryí (diploidních, haploidních, mutagenních apod.) (Krutina, 1988).

V této práci budou dále podrobněji rozvedeny pouze metody a látky přímo související se zadáním.

3.2.1. Teorie explantátových kultur

Na rozdíl od živočichů, kde procesy buněčné a tkáňové diferenciace jsou obecně ireverzibilní, existuje u rostlin schopnost přechodu diferenciovaných buněk a pletiv do meristemického stavu charakterizovaného intenzivním buněčným dělením s následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů, resp. 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 (Novák, 1990).

Ostatně termín totipotentní pochází z anglického "total genetic potential" (Moore, 1979).

3.2.2. Pracovní podmínky, vybavení

Nejdůležitější a naprosto klíčovou podmínkou kultivace rostlinných explantátů *in-vitro* je sterilita. Jakákoliv mikrobiální kontaminace rychle znehodnotí kulturu v níž se nachází

a může ohrozit i ostatní, kultivační média jsou totiž takřka ideálním prostředím pro růst širokého spektra mikroorganismů.

Kováč (1995), Jha and Gosh (2005) a Smith (2012) doporučují pro sterilizaci pracovních místností germicidní zářivky (UV-C), které efektivně ničí mikroorganismy a jejich zárodky ve vzduchu i na ozářených plochách. Používají se k desinfekci před samotnou prací, např. v noci, protože UV-C záření nesmí přijít do styku s lidským tělem. Veškeré pracovní nástroje a nádoby musí být sterilizovány horkovzdušným sterilizátorem, autoklávem a nebo chemicky desinfikovány. Veškerá práce s kulturami by měla být prováděna v boxech s laminárním prouděním sterilního vzduchu (tzv. flowboxech), které zajistí minimalizaci vzdušné kontaminace kultur. Kultivační média se sterilizují též pomocí autoklávu, samotné explantáty pak pomocí dezinfekčních činidel a destilované vody.

Smith (2012) také doporučuje držet v místnostech určených ke kultivaci nízkou vzdušnou vlhkost, jelikož vysoká vlhkost může vést k nežádoucímu množení mikroorganismů a tak zvyšovat riziko kontaminací.

3.2.2.1. Autokláv

Sterilizace autoklávováním se provádí v autoklávu a jedná se o sterilizaci horkou parou za zvýšeného tlaku. Tento způsob sterilizace se používá pro sterilizaci vatových zátek, plastických uzávěrů, filtrů, skla, pipet a především pro sterilizaci médií. Sterilizace se provádí při teplotě 121 °C a přetlaku 100kPa. Délka sterilizace je u médií závislá na objemu, u ostatního materiálu se používá doma 15-20 minut (Kováč, 1995).

3.2.2.2. Aseptický box (laminární box, flowbox)

Jedná se o zařízení sloužící k prevenci vzdušné kontaminace. Vzduch je hnán skrz vysoce efektivní filtr (HEPA), který odstraní 99,97% částic o průměru 0,3 μm. Filtrovaný vzduch proudící z boxu tak na pracovní ploše zajišťuje sterilní pracovní podmínky (Jha and Gosh, 2005).

3.2.3. Kultivační podmínky

Kultivační podmínky umožňují růst a vývoj v explantátové kultuře. Zahrnují především médium, které představuje zdroj energie, výživy a regulačních látek. Dále k nim patří světelný režim, tj. intenzita a kvalita světla a fotoperioda. Významnou úlohu hraje

i teplota. Do kultivačních podmínek musíme zahrnout i plynnou fázi uzavřeného kultivačního prostředí - zvýšený či snížený obsah některých plynů, případně množství vodní páry (Procházka a kol., 1997).

Kultivační podmínky lze tedy rozdělit na podmínky fyzikální (vnější vlivy) a chemické, které představuje hlavně kultivační médium.

3.2.3.1. Fyzikální podmínky kultivace

Teplota a světlo významně ovlivňují vývoj rostlinných explantátů. Příliš nízká teplota vede k významnému zpomalení, případně zastavení metabolických procesů v explantátech a tím negativně ovlivňuje rychlost růstu. Na druhou stranu příliš vysoká teplota má na růst obdobně negativní vliv.

Neumann et al. (2009) uvádí, že optimální teplota pro většinu explantátových kultur je v rozmezí 20 - 30 °C, ale měla by být definována pro konkrétní pěstovaný druh, jelikož druhové požadavky se různí. Například některé studované kultury vykazovaly nejlepší růstové vlastnosti v teplotním rozmezí 30-35 °C. Teplota se většinou po čas kultivace udržuje konstantní.

Světlo je pro rostliny, jakožto autotrofní organismy důležité především z hlediska fotosyntézy, ale může ovlivňovat i jiné procesy. Fotosynteticky aktivní explantáty vyžadují světlo pro svůj růst, ale například kalusové kultury, jejichž výživa je primárně heterotrofní mohou růst i ve tmě. Smith (2012) dodává, že většině explantátových kultur vyhovuje osvětlení fluorescenčními zářivkami se světelným spektrem podobným dennímu světlu. Optimální fotoperioda je 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Další z významných podmínek je také vlhkost vzduchu obklopujícího explantáty, ale vzhledem k tomu, že jsou pěstovány v uzavřených nádobách, je její regulace problematická. S vysokou vzdušnou vlhkostí je také spojen jev zvaný vitifikace. Kováč (1995) uvádí, že jde hlavně o nedokonalou funkci průduchů, špatně nebo vůbec vytvořenou kutikulu a tvorbu příliš vodnatých pletiv. Vitifikované rostliny jsou pouze v malém množství případů schopné převodu do podmínek *ex-vitro*.

3.2.4. Kultivační média

Média používaná v explantátových kulturách rostlin obsahují výživové látky, které jsou nezbytné pro růst a vývoj pěstovaných explantátů. Úspěch explantátové kultury velmi záleží na použitém typu média, různé druhy rostlin vyžadují různé látkové složení médií. Médium pro rostlinné buňky je komplexní. Optimální složení média pro dané využití závisí na druhu rostliny a způsobu použití. Podmínky pro pěstování běžných rostlinných buněk jsou dobře popsány, ale při práci s novými druhy musí být empiricky zjištěny. Složení média může být také změněno pro indukci určitého procesu. Nutriční požadavky daného pletiva musí být určeny pokusem a omylem. Je obtížné navrhnout jedno složení pro optimální růst všech rostlinných pletiv (Jha and Gosh, 2005).

Významnou součástí média jsou minerální živiny, tj. makroprvky a mikroprvky, a organické látky, především cukry, jako zdroje energie a uhlíku a důležitý faktor ovlivňující osmotickou hodnotu média, vitaminy a aminokyseliny a případně i další speciální organické látky. Všechny složky živného média se navzájem ovlivňují a společně se podílejí na usměrňování procesů, které probíhají v kultivovaných pletivech (Procházka a kol., 1997).

V závislosti na účelu může dále médium obsahovat regulátory růstu a ztužující látku. Jako ztužující látky pro přípravu pevných médií uvádějí Kováč (1995) a Jha and Gosh (2005) agar (používaný ve většině případů), agarosu a syntetický Phytigel (Gelrite).

Velký význam má také koncentrace vodíkových iontů (pH) v kultivačním médiu, Kováč (1995) doporučuje hodnotu 5,5-6,0, ale některé druhy mohou mít odlišné požadavky. PH se v případě potřeby může upravit pomocí hydroxidu draselného nebo kyseliny chlorovodíkové. Jha and Gosh (2005) dodávají, že pH média má výrazný vliv na jeho tuhnutí, agarové médium špatně tuhne při pH nižším než 5 a naopak při pH nad 6 může být médium příliš tuhé.

Existuje velké množství různých typů kultivačních médií navržených pro různá konkrétní použití a některá z nich se ukázala jako široce využitelná. V současné době je nejvýznamnějším MS médium (Murashige and Skoog, 1962). Jako další lze jmenovat média, která popsali Gamborg et al. (1968) - B5 médium, Shenk and Hildebrandt (1968) - SH médium a mnohá další.

3.2.4.1. MS médium

MS médium formulovali Murashige and Skoog (1962) za účelem *in-vitro* kultivace tabáku, posléze bylo zjištěno, že je mimořádně vhodné pro kultivaci širokého spektra explantátů různých rostlinných druhů a nyní je nejpoužívanějším živným médiem.

Jha and Gosh (2005) uvádějí, že jeho složení je odvozeno z analýzy obsahu látek v samotném použitém tabákovém explantátu. Toto médium se vyznačuje vysokým obsahem makroelementů, hlavně dusíku a draslíku.

Tabulka složení média je uvedena v praktické části práce.

3.3. Fytohormony, regulátory rostlinného růstu

3.3.1. Charakteristika látek regulujících růst rostlin

Procházka a kol. (1997) uvádějí, že rostlinný hormon (fytohormon) je látka syntetizovaná v jedné části rostliny, která po translokaci do části jiné vyvolává fyziologickou reakci a je účinná ve velmi malých dávkách. Fytohormony jsou přirozené regulátory růstu, jsou tedy endogenní. Druhou skupinou jsou pak regulátory růstu připravené synteticky nebo izolované jiných organismů, než jsou rostliny. Příkladem může být například auxin 2,4-D nebo cytokinin kinetin. Dříve bylo zvykem tyto látky s růstově regulačním účinkem dělit podle převažujícího stimulačního nebo naopak inhibičního efektu, od tohoto rozdělení se ovšem upouští, jelikož bylo prokázáno, že vysoká, nebo naopak nízká koncentrace regulátoru může mít opačný účinek.

Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem, a na druhé straně neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný růstový proces. Tento pleiotropní účinek fytohormonů lze uvažovat jako následek interakcí dvou, resp. tří složek. Hlavní složkou je počet aktivních molekul fytohormonu spojených s místem jejich účinku v buňce. Tako hodnota závisí na biosyntéze a metabolismu fytohormonů i na regulaci jejich importu a exportu (tj. transportu). Druhou složkou je senzitivita buněk k endogenním fytohormonům. Může být přesněji definována jako počet receptorů (vazebných míst) pro hormony a jejich afinita k fytohormonům (Procházka a kol., 1997).

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

obr. 2 klasifikace regulátorů rostlinného růstu

Nativní (přirozené) fytohormony	Syntetické
A. Růstové látky (stimulátory)	
<i>Auxiny</i> kyselina indolyl-3-octová (IAA) 4-chlor-IAA kyselina fenyl-octová (PAA) kyselina indolyl-3-máslná (IBA)	<i>Auxiny</i> kyselina α -naftyloctová (NAA) kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) kyselina 2,4,5-trichlorfenoxycetová (2,4,5-T) kyselina 2-metyl-4-chlorfenoxycetová (MCPA)
<i>Gibbereliny</i> (GA ₁ , GA ₂ , atd.)	–
<i>Cytokininy</i> izopentenyladenin <i>trans</i> -zeatin dihydrozeatin deriváty N ⁶ -benzyladeninu (BA) difenylmočovina tidiazuron	<i>Cytokininy</i> N ⁶ -benzyladenin (BA) N ⁶ -(<i>m</i> -hydroxybenzyl)adenin kinetin
B. Zábranné látky (inhibitory)	
kyselina abscisová (ABA) xantoxin kyselina jasmonová fenolické látky	maleinhydrazid (MH) kyselina 2,3,5-trijodbenzoová (TIBA) chlorcholinchlorid (CCC) ancymidol paclobutrazol AMO-1618 B-995 (kyselina N-dimethyljantarová)
C. Etylen	kyselina 2-chloretylfosfonová (CEPA)
D. Ostatní	
brassinolid polyaminy (spermin, spermidin) oligosachariny turgoriny	benzoinon a další (viz kap. 9 a 26)

Zdroj: Procházka a kol. (1997)

3.3.2. Klasifikace regulátorů rostlinného růstu používaných v explantátových kulturách

3.3.2.1. Auxiny

Moore (1979), Kováč (1995) a Procházka a kol. (1997,1998) uvádějí, že auxiny jsou nejstarší známou skupinou rostlinných hormonů, jejich existence byla prokázána už ve dvacátých letech 20.století. První známou látkou z této skupiny byla kyselina indolyl-3-octová (IAA).

Kyselina indolyl-3-octová byla dlouho jediným známým přirozeným auxinem. V rostlinách bylo nalezeno celé spektrum indolových sloučenin, z nichž mnohé jsou v metabolickém vztahu k IAA, ale nevykazují biologickou aktivitu. V poslední době, díky zavedení nových citlivých analytických technik, byly v rostlinách nalezeny kyseliny indolyl-3-máselná (IBA) a 4-chlor-IAA, dříve považované za látky syntetické. Dalším přirozeným auxinem je kyselina fenoxycetová (PAA). Při hledání látek s růstově regulační aktivitou byla nalezena řada syntetických látek s účinky podobnými účinkům IAA. Tyto látky nazýváme syntetické auxiny (Procházka a kol., 1998).

Pro přehlednost lze syntetické auxiny rozdělit do 5 skupin:

1. indolové kyseliny: Kyselina indolyl-3-propionová (IPA) má velmi slabou aktivitu, IBA a 4-Cl-IAA se vyskytují v rostlinách,
2. naftalenové kyseliny: α -naftylacetát (NAA), β -naftylacetát (NOA),
3. chlorfenoxycyseliny: 2,4-dichlorfenoxycetát (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxycetát (2,4,5-T), 2-methyl-4-chlorfenoxycetát (MCPA),
4. benzoové kyseliny: 2,3,6- a 2,4,5-trichlorbenzoát, dicamba,
5. deriváty kyseliny pikrolinové: picrolam.

Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti těchto látek jsou obdobné IAA a PAA; jde většinou o látky stálé (Procházka a kol., 1997).

Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtlů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtlů (Kováč, 1995).

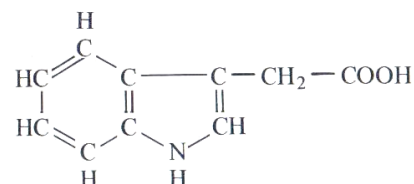
Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v kultivačním médiu. Iniclace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace

tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu k cytokininu vysoký. Je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventivních, či axilárních prýtů (Kováč, 1995).

Kyselina indolyl-3-octová (IAA)

IAA je pravděpodobně nejvýznamnějším nativním auxinem, dle Procházky a kol. (1997) se jedná o krystalickou látku špatně rozpustnou ve vodě v kyselé a neutrální oblasti, dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech a ve vodném alkalickém prostředí. Je to slabá organická kyselina, dosti nestálá, snadno dekarboxyluje. Je citlivá se světlu a zejména k UV záření.

obr. 3 IAA

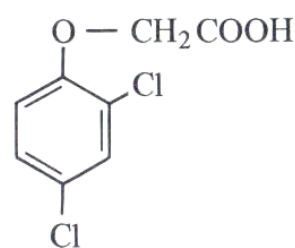


Zdroj: Moore (1979)

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)

2,4-D je jeden z nejvýznamnějších syntetických auxinů, Jha and Gosh (2005) uvádějí, že jde nejspíše o nejúčinnější auxin používaný v explantátových kulturách, dle Kováče (1995) jeho účinnost 8-12x převyšuje IAA. Vlastnostmi je podobná ostatním auxinům, ale Procházka a kol. (1997) dodávají, že jde o látku stálou.

obr. 4 2,4-D



Zdroj: Moore (1979)

3.3.2.2. Cytokininy

Moore (1979) uvádí, že prvním známým regulátorem rostlinného růstu ze skupiny cytokininů byl kinetin (6-furfurylaminopurin, KN). Ten se podařilo extrahovat z autoklávané DNA sparmatu sledě, není tedy rostlinného původu. První nativní cytokinin byl extrahován z nezralých zrn kukuřice (*Zea mays*) a byl pojmenován zeatin.

V současné době známe přes 30 přirozených cytokininů. Strukturálně všechny vycházejí z adeninu substituovaného na exocyklické aminoskupině v poloze N-6. Další skupina cytokininů obsahuje aromatický substituent. Patří sem zejména N⁶-benzyladenin a jeho deriváty s hydroxylovaným benzenovým jádrem v poloze *orto* a *meta*. Cytokininy odvozené od N⁶-benzyladeninu byly dlouho pokládány za syntetické růstové regulátory. Jejich existence jako přírodních látek byla zjištěna poměrně nedávno. Vše nasvědčuje tomu, že se uplatňují zejména při regulaci morfogeneze a zpomalování stárnutí rostlin (Procházka a kol., 1997).

Některé aromatické deriváty močoviny a thiomčoviny jsou vysoce aktivní v biotestech na cytokininy. Nejaktivnější jsou N,N'-difenylmočovina, N-fenyl-N'-pyridylmočovina a tidiazuron (TDZ) a jejich deriváty (Procházka a kol., 1998).

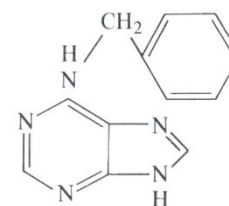
Jha and Gosh (2005) popisují jako hlavní účinky cytokininů v explantátových kulturách podporu buněčného dělení, podporu růstu výhonů, ovlivňování buněčného cyklu, indukci axilárního větvení, tvorbu adventivních výhonů, embryogenezi a inhibici růstu kořenů.

Cytokininy obecně popisuje Procházka a kol. (1997) jako skupinu rostlinných hormonů vyznačující se schopností stimulovat v přítomnosti auxinu buněčné dělení některých rostlinných tkáňových kultur.

6-benzylaminopurin (6-benzyladenin, BAP)

Dle Kováče (1995), a Procházky a kol. (1997,1998) jde o jeden z nejčastěji používaných cytokininů v explantátových kulturách, hned vedle tidiazuronu (TDZ) a kinetinu. Dlouho byl považován za čistě syntetickou látku, ale společně s jeho dalšími deriváty byl prokázán nejdříve v topolu a poté v mnoha dalších rostlinách. Jedná se o stabilní látku špatně rozpustnou ve vodě, dobře se rozpouští v roztocích 1M HCl a 1M NaOH.

obr. 5 BAP



Zdroj: Moore (1979)

3.3.2.3. Gibereliny

Procházka a kol. (1998) uvádějí, že k objevu giberelinů přispěl výzkum houby *Gibberella fujikuroi*, která způsobovala nepřiměřený dlouhivý růst rýže. Z bezbuněčného extraktu této houby byla posléze extrahována kyselina giberelová (GA₃).

Je známo zhruba 90 giberelinů, nejčastější z nich je GA₃. Gibereliny nejsou často používány v živných médiích. Jejich hlavní účinky v explantátových kulturách jsou prodlužování stonků, formování cibulek a hlíz, dozrávání embryí, ale také mohou inhibovat růst kalusu a kořenů (Jha and Gosh, 2005).

Z chemického hlediska se jedná o diterpeny (Moore, 1979).

3.3.2.4. Kyselina abscisová

Procházka a kol. (1997,1998) a Moore (1979) uvádějí, že kyselina abscisová byla objevena v několika výzkumech současně, měla proto více názvů, např. dormin nebo abscisin.

Kyselina abscisová (ABA) je seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule. Může se vyskytovat ve formě několika izomerů; fyziologicky aktivní je výhradně její (+)-S-izomer. Většina chemických změn v molekule kyseliny abscisové vede ke značné redukci až ztrátě aktivity. Výjimkou jsou epoxysloučeniny s vysokou aktivitou - takovou látkou je xantoxin, přímý prekurzor kyseliny abscisové (Procházka a kol.,1998).

Její použití v explantátových kulturách není tak časté, jako možnosti jejího využití uvádějí Jha and Gosh (2005) a Kováč (1995) hlavně inhibici růstu prýtlů a předčasného klíčení embryí, případně jejich optimální dozrávání.

3.4. Vývoj explantátů v podmínkách *in-vitro*

3.4.1. Regenerace přímá a nepřímá

K regeneraci může docházet přímo na izolovaném pletivu buď ze založených základů, nebo *de novo* tak, že buňka nebo buňky, které dediferenciovaly, se začnou podílet bezprostředně na vytváření nové struktury. V obou uvedených případech se jedná o regeneraci přímou. Jindy dělení meristematičtých buněk vnesených spolu s explantátem nebo vzniklých dediferenciací vede nejprve k vytváření kalusu a teprve v takto vzniklé kalusové kultuře dojde, většinou po změně kultivačních podmínek, k regeneraci nových struktur. V tomto případě se hovoří o regeneraci nepřímé. Mezi původní organizovanou strukturou explantátu a nově vzniklou organizovanou strukturou je tedy kalusové stadium (Procházka a kol., 1998).

Novák (1990) popisuje dediferenciaci jako proces, při kterém trvalé pletivo resp. diferencované buňky revertují do meristematičtého stavu a vytvářejí neorganizovaný kalus.

Diferenciace rostlin *in vitro* probíhá v těchto různých systémech:

- 1) organizované struktury - meristémy a zygotická embrya,
- 2) diferencovaná pletiva resp. komplexy pletiv,
- 3) pletiva na různém stupni dediferenciace, zejména ve formě kalusu,
- 4) izolované buňky a protoplasty.

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

3.4.2. Způsoby regenerace

Morfogeneze či regenerace probíhá v podmínkách *in vitro* v zásadě dvěma způsoby: organogenezí nebo embryogenezí (Procházka a kol., 1998).

3.4.2.1. Organogeneze

Procházka a kol. (1998) popisují organogenezi jako proces regenerace jednotlivých rostlinných orgánů nebo jejich souborů, například kořenů, prýtů, ale i cibulek či hlízek. Nevzniká však bezprostředně celistvá rostlina, ale jen její části, které vyžadují další kultivaci.

Obecný model regenerace rostlin *in vitro* v prvním stupni vyžaduje regeneraci prýtů na cytokininovém médiu a ve druhém stupni jejich zakořenění na auxinovém médiu (Novák, 1990).

Při organogenezi, ke které dochází ze základů, jež se již vyvinuly před odběrem explantátu, se uplatňují obdobné zákonitosti jako na intaktní rostlině. Tak je tomu v případě izolovaných apikálních či axiálních meristémů, u kterých cytokinin potlačuje apikální dominanci, a tak vyvolává okamžitou tvorbu postranních větví z právě založených axilárních meristémů (Procházka a kol. 1998).

Kováč (1995) popisuje tyto metody využívající přímé regenerace: metoda kultivace vzrostných vrcholů a metoda kultivace jednonodálních segmentů. Obecně je jejich cílem získání tzv. kultury mnohonásobných prýtů, které slouží jako zdroj dalších explantátů, nebo jako řízky k zakořenění a získání finálních rostlin. Jde o nejpřirozenější metody mikropropagace, navíc při nich není porušena integrita rostliny (pupenů) a tak tento způsob množení poskytuje geneticky stabilní klony.

Druhou cestou je nepřímá organogeneze, kdy dochází nejprve k tvorbě kalusu a až potom k samotné organogenezi.

Při organogenezi víceméně platí pravidlo, které formulovali Skoog and Miller (1957). Průběh organogeneze přímo závisí na obsažených regulátorech rostlinného růstu a jejich poměru. Vysoká koncentrace auxinu a nízká koncentrace cytokininu indukuje tvorbu kořenů,

při vyrovnané koncentraci dochází k tvorbě neorganizovaného kalusu a při vysoké koncentraci cytokininu na úkor auxinu jsou regenerovány prýty.

Často také záleží na aktivitě daného regulátoru, například Novák (1990) a Procházka a kol. (1998) uvádějí, že auxin 2,4-D je tak efektivní, že často indukuje tvorbu kalusu i při neodpovídajících poměrech s cytokininem, případně dokonce při jeho vynechání.

Kořenové a stonkové meristemoidy se zakládají v kalusovém pletivu nezávisle. Vzhledem k tomu, že diferenciaci obou struktur vyžaduje rozdílné hormonální složení kultivačního média, zřídka kdy dojde k regeneraci celých rostlin v průběhu jedné subkultury. Organogeneze může vycházet z jediné somatické buňky, avšak častější jsou případy diferenciaci meristemoidů z několika vzájemně prostorově (zřejmě i funkčně) komunikujících buněk (Novák, 1990).

Proto Novák (1990) a Procházka a kol. (1998) zdůrazňují riziko vzniku genetických chimér při nepřímé organogenezi.

3.4.2.2. Embryogeneze

V normálních podmínkách představuje embryogeneze proces, při kterém postupným strukturálními změnami vzniká z jedné buňky zárodek. Uvedenou první buňkou bývá nejčastěji zygota, jež vzniká splynutím samčí a samičí pohlavní buňky. Dělením zygoty se přes různá stadia vyvíjí dospělý (zralý) zárodek, který je uložen v semeni. To pak za normálních podmínek vyklíčí a vzniká celistvá rostlina. Průběh embryogeneze je odlišný u jednotlivých skupin rostlin. Významně se od sebe liší především rostliny nahosemenné a krytosemenné, ale i v rámci těchto velkých skupin je řada různých modifikací (Procházka a kol., 1998)

V umělých podmínkách kultivace (*in-vitro*) se však mohou zárodky vyvíjet i dalšími více či méně přirozenými způsoby, Procházka a kol. (1998) proto rozlišují tyto čtyři typy embryogeneze:

- embryogenezi zygotickou
- embryogenezi gametofytickou (prezygotickou)
- embryogenezi somatickou (postzygotickou)
- somatickou polyembryogenezi

Zygotická embryogeneze

Kultivace embryí *in vitro* je nejstarší oblast explantátových kultur, kdy bylo dosaženo regenerace celých rostlin z izolované části organismu (Novák, 1990).

Při zygotické embryogenezi je základem vyvíjejícího se embrya zygota. Ta může vzniknout buď před izolací explantátu, nebo i po jeho izolaci (Procházka a kol., 1998).

Procházka a kol. (1998) tedy rozlišují dva způsoby zygotické embryogeneze a to:

1) kultury izolovaných embryí neboli embryokultury, kdy je kultivován zárodek vzniklý ještě před odběrem explantátu.

Čím je zárodek méně vyvinutý, tím musí být složitější kultivační médium. To musí obsahovat řadu organických látek od aminokyselin přes růstové látky až k různým vitaminům. Významně pozitivní vliv mohou mít ne přesně definované směsi látek, jako jsou kokosové mléko, kvasničný extrakt či hydrolyzáty kaseinu. Velkou roli hraje osmotická hodnota média, která musí být poměrně vysoká. S pokročilejšími vývojovými stadii se zjednodušuje složení kultivačního média. Nejpokročilejším vývojovým stadiím pak často stačí při kultivaci roztok sacharózy ztužený agarem (Procházka a kol. 1998).

2) explantáty, ve kterých ještě nedošlo k oplození a nevznikla zygota, v tomto případě jako explantát poslouží květ, pestík, placenta s vajíčky nebo samotná vajíčka, k opylení pak dochází uměle v podmínkách *in-vitro*.

Gametofytická embryogeneze

Embryogenezi lze vyvolat *in vitro* i u některé z buněk gametofytu. U semenných rostlin se tento vznik embryí rozděluje podle toho, s jakým gametofytem vznikají, na gynogenezi a androgenezi (Procházka a kol., 1998).

Výsledkem **gynogeneze** i **androgeneze** jsou pak haploidní regenerované rostliny, které nalézají široké využití hlavně ve šlechtitelství.

Stručná definice těchto metod vycházející z Nováka (1990) a Procházkovy a kol. (1998):

Při gynogenezi dochází k regeneraci z haploidních buněk zárodečného vaku, ve srovnání s celistvou rostlinou tedy jde o apomixii. Jako explantáty slouží celé pestíky, jejich části, nebo izolovaná vajíčka. Embryogeneze tohoto typu je ovšem známa u relativně malé

skupiny rostlin a ke gynogenezi dochází obvykle maximálně u 15% explantátů. Někdy se nepodaří navodit embryogenezi, ale pouze vznik nediferencovaného haploidního kalusu, který může být regenerován, ale díky spontánní diploidizaci mohou pak vznikat rostliny na různém stupni ploidie.

Naopak při androgenezi dochází ke vzniku zárodků z pylových zrn v procesu pylové embryogeneze. Kultivační podmínky *in-vitro* umožňují atypický růst pylových zrn, kdy přes stádia klasické zygotické embryogeneze vznikají haploidní zárodky. Pro naprostou většinu postupů je typické vyvolání šoku (teplotního, osmotického,...) na kultivovaná pylová zrna, který spustí jejich abnormální vývoj. Přítomnost růstových regulátorů se dramaticky liší podle druhu rostliny a jejich přítomnost v kultivačním nemusí být nezbytná. Regenerace může, stejně jako u gynogeneze, probíhat také nepřímou cestou přes vytvoření haploidního kalusu.

Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je podrobně rozebrána i s příklady dále v této práci.

Somatická polyembryogeneze

Procházka a kol. (1998) uvádějí, že tento jev je charakteristický hlavně pro jehličnany.

V normálních podmínkách má všeobecné rané somatické jehličnanů silně vyvinutý suspenzorový aparát a skupinu embryonálních buněk, ze kterých v dalších fázích vzniká vlastní zárodek. Stejně nebo téměř stejně je tomu i v umělé kultuře. První raná somatická embrya vznikají při kultivaci nezralých nebo zralých zygotických embryí ze zadržovaných embryí, která se nacházejí v oblasti suspenzoru nebo jeho zbytků a která vznikla štěpením původního jednoho zygotického embrya. Přenesení do umělých podmínek umožňuje jejich další vývoj, ke kterému by za normálních podmínek nedošlo. Vedle toho vznikají další raná embrya na dalších částech izolovaného zygotického embrya, např. na dělohách. Podařilo se je odvodit i na jehlicích klíčnicích rostlin. Tato embrya vznikají pravděpodobně normální přímou nebo nepřímou somatickou embryogenezi. V každém případě vedle nich vzniká i kalusové pletivo. Není však obtížné vzniklá raná somatická embrya od kalusu izolovat. Raná somatická embrya se takto množí opakovaně. Rychlost celého procesu, který probíhá většinou za přítomnosti kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a cytokininu je značná. Pro další vývoj raných somatických embryí je třeba změnit kultivační médium. Nejdříve se zvýší jeho osmotická hodnota. Poté vlivem kyseliny abscisové pokračuje vývoj směrem k plně vyvinutým

embryím. Ta se dále obvykle vyvíjejí bez přítomnosti růstových látek (Procházka a kol., 1998).

3.4.3. Somatická embryogeneze

Zárodek (embryo) může vznikat i ze somatických buněk.

Novák (1990) a Procházka a kol. (1998) uvádějí, že tento jev je možný i v přírodě v přirozených podmínkách, jedná se o apomixii u některých druhů (př. *Citrus*) kdy zárodek vzniká z diploidních buněk pletiv vajíčka a semeníku, případně u několika dalších druhů z buněk listů, ale to je výjimečné.

Kováč (1995) a Novák (1990) rozdělují somatickou embryogenezi u explantátových kultur na dvě rozdílné vývojové možnosti:

- 1) Přímá somatická embryogeneze, kdy je vývoj embrya iniciován z jediné buňky explantátu (nejčastěji epidermis) bez tvorby kalusu. To je vysvětlováno přítomností proembryonálních determinovaných buněk (PEDC), které je možno stimulovat k vývoji somatických embryí.
- 2) Nepřímá somatická embryogeneze, kdy je uměle stimulována tvorba tzv. indukovaných embryogenně determinovaných buněk (IEDC), které jsou embryogenně kompetentní a ze kterých pak mohou vznikat somatická embrya.

Procházka a kol. (1998) uvádějí ještě sekundární somatickou embryogenezi, spadající pod regeneraci přímou (1). V tomto případě nová embrya vznikají z pokožkových buněk embryí, která vznikla bezprostředně předtím také somatickou embryogenezí.

Je zřejmé, že oba typy embryogenně kompetentních buněk se nacházejí na určitém stupni diferenciaci, který určuje jejich strukturu i funkci. Například buněčná suspenze mrkve je složena ze dvou typů buněk:

- 1) velkých a vysoce vakuolizovaných parenchymatických buněk, které ztratily embryogenní potenciál a jsou volně rozptýleny v médiu,
- 2) malých buněk s hustou cytoplazmou, které tvoří buněčné shluky. Tento typ buněk je embryogenně kompetentní a po určitém vnějším stimulu se začne vyvíjet v organizovanou strukturu somatického embrya (Novák, 1990).

Průběh somatické embryogeneze lze rozdělit do několika hlavních fází: indukce, vývoj somatických embryí, jejich zrání a klíčení.

Indukce vlastně představuje fázi, při které somatická buňka nabývá stejných vlastností, jako má zygota. Některé buňky k tomu potřebují vymanění z vlivu celistvé rostliny a umístění na jednoduché kultivační médium, jiné buňky vyžadují složitější zásahy, aby se staly tzv. embryogenně determinovanými. Pro jejich indukci má v naprosté většině případů zásadní význam přítomnost látek auxinového charakteru v kultivačním médiu. K nejvýznamnějším patří kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová, méně se uplatňuje kyselina α -naftyloctová (Procházka a kol., 1998).

Procházka a kol. (1998) také uvádějí významnou vlastnost tohoto typu množení a to, že v žádné z možností somatické embryogeneze nevznikají chiméry, které často vznikají při organogenezi (somatická embrya mají původ v jednotlivých buňkách).

Na rozdíl od zygotických embryí nevytváří somatická embrya funkční suspenzor. Somatická embrya často vytvářejí více děloh a za nevyvážených podmínek výživy *in vitro* jsou u nich časté další morfologické odchylky. Abnormální proliferaci embryí (repetitivní tvorba embryí), tvorbě nadpočetných děloh a předčasnému klíčení embryí je možné v některých případech zabránit aplikací kyseliny abscisové (ABA) do kultivačního média (Kováč, 1995).

Velmi důležitou roli hrají růstové látky. Jak už bylo uvedeno, pro indukci embryogenních buněk je nutná přítomnost látek auxinové povahy, především 2,4-D, na počátku kultivace. Využívají se i značně vysoké koncentrace, ale pouze po omezenou dobu (tzv. pulzní působení). Po snížení koncentrace těchto látek dochází k průběhu vlastní embryogeneze. V této době je nutná přítomnost cytokininů, pokud tyto látky už nebyly v médiu i v první fázi (Procházka a kol., 1998).

Dozrávání a následné klíčení somatických embryí probíhá již na živném médiu bez regulátorů růstu, nebo pouze s velice nízkou koncentrací (Jain et al., 2002).

3.4.3.1. Příklady

Při kultivaci bazalky pravé (*Ocimum basilicum* L.) použili Gopi and Ponmurugan (2006) explantáty z mladých listů. Tvorba kalusu byla iniciována na MS médiu obsahujícím 3% sacharózy, 0,9% agaru a $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,4-D. Diferenciace embryí začala na po přesunu

kalusů na MS médium obsahující 0,5 mg. l⁻¹ 2,4-D a 1,0 mg. l⁻¹ BAP. Dozrávání, klíčení a produkce nových embryí pak pokračovalo na MS médiu s BAP 1,0 mg. l⁻¹ + NAA 1,0 mg. l⁻¹ + KN 0,5 mg. l⁻¹. Kompletní rostlinky byly poté přesazeny do plastových kelímků se substrátem a po aklimatizaci do venkovních podmínek.

Piovan et al. (2014) indukovali přímou i nepřímou somatickou embryogenezi u *Brassica repanda* subsp. *glabrescens*. Pro nepřímou somatickou embryogenezi využili explantátů z kořenů a listů semenáčů starých 3 týdny, pro přímou pak celých semenáčů starých 2 týdny. K vyvolání nepřímé somatické embryogeneze byla nejvhodnější kombinace regulátorů 1,0 mg. l⁻¹ BAP a 1,0 mg. l⁻¹ NAA, pro přímou cestu bylo nejvhodnější 1,0 mg. l⁻¹ BAP a 1,0-2,0 mg. l⁻¹ NAA. Dozrávání a klíčení embryí probíhalo na MS médiu poloviční koncentrace s 3% sacharózy. Největší výnos embryí byl u celých semenáčů a listových explantátů.

Manrique-Trujillo et al. (2013) se zabývali vlivem různých auxinů (2,4-D a 2,4,5-T), kyseliny abscisové (ABA) a kyseliny giberelové (GA₃) na průběh somatické embryogeneze u povijnice batátové (*Ipomoea batatas*), konkrétně odrůd 'Jonathan' a 'Jewel'. V první fázi byly ve tmě kultivovány laterální meristémy na MS médiu s 3% sacharózy a 1,3 mg. l⁻¹ 2,4,5-T (2,4-D vykazovalo nižší aktivitu). Vzniklé embryogenní kalusy byly pasážovány na MS médium obsahující 1 mg. l⁻¹ ABA pro optimalizaci zrání embryí. Vývoj rostlinek z embryí probíhal nejlépe na MS médiu s 0,424 mg. l⁻¹ GA₃.

Karami et al. (2006) studovali vliv koncentrace sacharózy v kultivačním médiu na průběh somatické embryogeneze u hvozdíku karafiátu (*Dianthus caryophyllus* L.). Explantáty byly odebrány z okvětních lístků a kultivovány na MS médiích obsahujících 0,989 mg. l⁻¹ 2,4-D (9μM), 0,1802 mg. l⁻¹ BAP (0,8μM) a různé koncentrace sacharózy. Největší frekvence tvorby embryogenního kalusu bylo dosaženo při koncentracích 9 a 12% sacharózy. Indukce somatických embryí probíhala na MS médiu bez regulátorů. Počet vznikajících embryí se zvyšoval s koncentrací sacharózy až k 12%, při 15 a 18% již klesal. Vzniklá embrya regenerovala v celé rostliny po přesunu na poloviční MS médium s 3% sacharózy a bez regulátorů.

Somatickou embryogenezi u *Cephaelis ipecacuanha* popsali Rout et al. (2000). Listové explantáty vytvořily kalus na MS médiu s 3% sacharózy, 0,5 mg. l⁻¹ kinetinu a 4,0 mg. l⁻¹ 2,4-D. Somatická embryogeneze byla indukována na MS médiu s 3% sacharózy, 2,5

mg. l⁻¹ kinetinu a 1,0 mg. l⁻¹ 2,4-D. Dozrávání a klíčení embryí pak na MS médiu s 2% sacharózy a bez regulátorů. Rostliny byly přesazeny do substrátu a před výsadbou ven kultivovány ve skleníku.

3.4.3.2. Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*)

Jain et al. (2002) dosáhli nejlepších výsledků při kultivaci na klasickém MS médiu s 3% sacharózy, v první fázi kultivace byla stimulována tvorba kalusu aplikací 2 mg. l⁻¹ IAA a 0,5 mg. l⁻¹ BAP. Pro indukci somatické embryogeneze byly kalusy přeneseny na médium obsahující 0,5 mg. l⁻¹ IAA a 1,5 mg. l⁻¹ BAP. Následně byla vzniklá somatická embrya kultivována na MS médiu poloviční koncentrace s 2% sacharózy a bez růstových regulátorů. Po vyklíčení byla embrya přesazena do sterilního substrátu a postupně aklimatizována pro venkovní podmínky ve skleníku.

3.4.4. Fáze mikropropagace

Vývoj rostlin v podmínkách *in-vitro* je možné rozdělit do 4 základních stádií nebo fází.

V prvním stádiu jde o odvození sterilní kultury - primokultury, které spočívá v odebrání vhodného explantátu a jeho sterilizaci a kultivaci na živném médiu. Materiál odvozený v primokultuře je potom využíván ve druhém stádiu, které se označuje jako stádium multiplikační či proliferační. Cílem druhého stádia je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat co největší počet nových rostlin, resp. nových explantátů. Toto stádium může být opakováno pasážováním na téže proliferační médium nebo může následovat třetí stádium, které je většinou spojeno s zakořeňováním. Poslední, čtvrté stádium představuje stádium převodu rostlin z podmínek *in-vitro* do podmínek *in-vivo* a je spojeno někdy se zakořeňováním *in-vivo*. Tato stádia jsou charakteristická určitým vývojem kultury *in vitro*, který je ovlivněn změnou kultivačních podmínek v těchto jednotlivých stádiích. K těmto základním stádiím je někdy zařazováno stádium 0, které představuje fázi, kdy je určitým způsobem připravován matečný materiál (rostlina) k odběru explantátu (Kováč, 1995).

3.4.4.1. Stádium 0 - výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátů

Při odběru výchozího materiálu pro odvození explantátové kultury je nutné znát přesně původ matečné rostliny - o jakou varietu či kultivar se jedná. Výchozí rostlina by měla

být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách - nejlépe skleník nebo fytotron. Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován obdobím roku, kdy je explantát odebrán. Změny teploty, délky dne, hladiny osvětlení, dostupnosti vody v průběhu roku ovlivňují obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlinách a mají tak vliv i na růst explantátů, z nich odebraných. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu (Kováč, 1995).

3.4.4.2. Stádium 1 - odvození aseptické kultury

Prvním předpokladem úspěšné kultivace *in vitro* je výběr vhodné rostliny, která bude použita k odběru explantátů. Teoreticky je k odvození explantátové kultury možné použít jakoukoliv část rostliny (explantát). Hlavním cílem tohoto stádia je odvodit sterilní kulturu (primokulturu) s co největším procentem úspěšnosti. Odvození sterilní primokultury je spojeno s povrchovou dezinfekcí materiálu používaného jako explantát. Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou dezinfekci pomocí jednoho nebo více dezinfekčních činidel. Po dezinfekci, resp. sterilizaci je nutné dezinfekční roztok z explantátu dokonale odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poškozené konce explantátu se odstraní skalpelem a explantát se upraví do požadované velikosti popř. se z něho izolují vlastní explantáty (Kováč, 1995).

3.4.4.3. Stádium 2 - fáze růstu explantátové kultury

Hlavním cílem stádia II je namnožení explantátů. Rostlinný materiál ze stádia I (primokultury) je opakovaně pasážován na čerstvé médium, přičemž se v závislosti na dosaženém koeficientu množení zvyšuje počet explantátů v kultuře. Tento proces množení trvá až do dosažení žádaného počtu explantátů (prýtů, buněk, somatických embryí, pacibulek, atd.) (Kováč, 1995).

3.4.4.4. Stádium 3 - zakořeňování *in-vitro*

Prýty odvozené *in vitro* mohou tvořit kořeny buď *in vitro* ve stádiu III nebo *in vivo* ve stádiu IV. Stádium III představuje většinou jednorázovou kultivaci prýtů odvozených ve stádiu II po dobu 2-4 týdnů. V průběhu této kultivace prýty zakoření. Zakořeňování rostlin představuje jednu z nejobtížnějších etap mikropropagace celé řady rostlin (Kováč, 1995).

3.4.4.5. Stádium 4 - zakořeňování *in-vivo*

Zakořeňováním *in vivo* se rozumí zakořeňování prýtů odvozených *in vitro* v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média. Jedná se různé umělé půdy popř. porézní materiály. Příkladem mohou být perlit, vermikulit, směsi obsahující písek, rašelinu, čedičovou vatu atd. (Kováč, 1995).

4. Metodika

4.1. Vybavení, pracovní a kultivační podmínky

Veškerá práce s *in-vitro* kulturami byla prováděna v laboratoři k tomu vybavené, kultivace pokusných kultur probíhala ve speciálním stojanu s lineárními zářivkami (bez regulace teploty) a inkubátoru.

Kultury byly pěstovány při jednotné fotoperiodě osvětlení 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplota v inkubátoru byla za světla 23 °C a za tmy 18 °C. Kultivační podmínky v inkubátoru byly stabilní a neměnné. Naopak stojan použitý v prvním pokusu a pro pěstování kultur prýtů neměl možnost regulace teploty - pohybovala se v rozmezí 18 °C a 28 °C v závislosti na okolních podmínkách. Docházelo zde také k nežádoucímu zahřívání kultur stoupajícím ohřátým vzduchem z osvětlení v nižších patrech. Výchozí rostliny byly od vyrašení až do odběru explantátů pěstovány ve skleníku aby se snížila pravděpodobnost kontaminace mikroorganismy.

Práce na pokusech probíhala ve flowboxu, nástroje (skalpel, jehla, pinzeta,..), sklo a kultivační média byla sterilizována pomocí autoklávu (standardní sterilizace - tlak 101,5 kPa a teplota 121 °C po dobu 20 minut), substrát pro dopěstování somatických embryí byl sterilizován v mikrovlnné troubě (výkon 800w, 1-2 minuty v závislosti na objemu). V průběhu práce ve flowboxu bylo šíření nežádoucích mikroorganismů také minimalizováno průběžným desinfikováním pracovní plochy, nástrojů a skla technickým ethanolem a případně nad plamenem lihového kahanu. Samozřejmostí pak bylo důkladné mytí rukou, používání ochranných pomůcek a udržování čistoty pracovního prostředí.

4.2. Média a regulátory rostlinného růstu

Jako základní kultivační médium bylo zvoleno MS médium. Pro jeho takřka univerzální využitelnost bylo použito v práci zabývající se somatickou embryogenezí u *Phlox paniculata* (Jain et al., 2002), jeho úspěšné využití u explantátových kultur *Phlox paniculata* dále uvádějí Matiska (2009) a Declerck and Korban (1995).

První fáze kultivace explantátů probíhala na MS médiu s kompletním obsahem živin, fáze dozrávání a klíčení somatických embryí pak na MS médiu poloviční koncentrace živin a s 2 % sacharózy (2/3 obsahu plného MS média) podle doporučení Jain et al. (2002).

MS médium pro indukci tvorby embryogenního kalusu bylo obohaceno o regulátory rostlinného růstu (RRR) 2,4-D, IAA a BAP v různých kombinacích a koncentracích., některé vycházely z Jain et al. (2002) další z teoretických předpokladů tvorby kalusů a indukce somatické embryogeneze a pak z poznatků získaných v průběhu experimentů. Médium pro dozrávání a klíčení somatických embryí neobsahovalo žádné RRR.

4.2.1. Příprava MS média

MS médium se míchá z předem připravených zásobních roztoků, složek navážených samostatně a destilované vody. Složení jednotlivých zásobních roztoků může být různé, v této práci byl využit postup uvedený v následující tabulce. Při přípravě 1 litru média se nejprve odměří zásobní roztoky v uvedeném pořadí do 1000ml odměrné baňky, následně se odváží sacharóza, agar a myo-inositol, tyto tři látky se destilovanou vodou převedou do roztoku (v případě agaru suspenze) a v daném pořadí vmíchají do směsi v odměrné baňce. Vzniklá směs živin a agaru je pak doplněna destilovanou vodou po rysku odměrné baňky. Tekuté médium se převede do vhodné nádoby (kádinka, erlenmeyerova baňka) a upraví se jeho pH na optimální hodnotu 5,7 - 5,8. Ke zvýšení pH byl použit 1M roztok hydroxidu draselného, ke snížení pak 1M roztok kyseliny citronové. Pokud má médium obsahovat RRR je nutné je přidat ještě před úpravou pH ve formě předpřipravených roztoků.

Médium určené k plnění petriho misek se autoklávuje hromadně v 1 l erlenmeyerových baňkách a do jednotlivých misek se rozlévá ve flowboxu již sterilizované, v případě plnění 100 ml erlenmeyerových baňek je médium rozvařeno v mikrovlnné troubě do dokonalého rozpuštění všech složek (při výkonu 800W zhruba 10-15

minut při přípravě 1 litru) a pak rozlito do baněk ještě před jejich samotnou sterilizací v autoklávu.

Zásobní roztok A:	Navážka na 1 l:
NH ₄ NO ₃	16,5 g
KNO ₃	19,0 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	4,4 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3,7 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
Zásobní roztok B:	Navážka na 1 l:
H ₃ BO ₃	0,62 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O (H ₂ O)	2,23 g (1,69 g)
ZnSO ₄ . 4 H ₂ O (7 H ₂ O)	0,86 g (1,06 g)
Zásobní roztok C:	Navážka na 1 l:
KJ	0,083 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,025 g
Zásobní roztok D:	Navážka na 1 l:
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0025 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0025 g
Zásobní roztok E:	Navážka na 1 l (0,5 l):
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	3,73 g (1,86 g)
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78 g (1,39 g)
Zásobní roztok V:	Navážka na 1 l:
kyselina nikotinová	0,05 g
pyridoxin	0,05 g
thiamin	0,01 g
glycin	0,20 g
Přímá navážka:	
sacharosa	30,0 g

agar	8,0 g
myo-inositol	0,1 g
Na 1 l média pipetovat:	100 ml A
	10 ml B
	10 ml C
	10 ml D
	10 ml E
	10 ml V
pH upravit na 5,7 – 5,8	

4.2.2. Použité varianty

Celkem byly zkoumány tyto varianty (uvedeno množství RRR na 1 litr kultivačního média):

Kontrola (bez regulátorů - pro srovnání)

2,4-D 1 mg

2,4-D 2 mg

BAP 5mg

BAP 1,5 mg + IAA 0,5 mg

BAP 5 mg + IAA 1,5 mg

BAP 0,5 mg + 2,4-D 1 mg

BAP 0,5 mg + 2,4-D 2 mg

4.3.Odběr a ošetření explantátů

Výchozí rostliny byly před odběrem explantátů kultivovány ve sklenicích areálu ČZU pro minimalizaci kontaminace rostlin škůdci a patogeny z venkovního prostředí. Rostliny v květináčích byly do skleníku umístěny na začátku jara ještě před vyrašením, ve skleníku rychle obrazily a po dosažení výšky prýtů zhruba 20cm byly připraveny k prvnímu odběru explantátů (pokus č.1), odběr pro pokus č.2 následoval po několika týdnech.

Jako nejvhodnější explantáty byly zvoleny segmenty listů odebraných z horní třetiny výhonů. Byly vybírány listy dosahující minimálně 2/3 plné velikosti, rozdíl mezi explantáty z dospělých a mladých listů nebyl zkoumán.

Jelikož explantáty musí být před kultivací *in-vitro* sterilní, bylo nejprve nutné experimentálně zjistit jak je co nejefektivněji desinfikovat při pouze minimálním nebo žádném poškození pletiv. Jako desinfekční činidlo byl zvolen vodný roztok chlornanu sodného (NaClO) - komerční desinfekční přípravek SAVO (4,7 % NaClO) s několika kapkami smáčedla (přidáváno dokud nezačal roztok pěnit). Na pokusných listech bylo jako nejvhodnější zjištěno použití 20% roztoku sava po dobu 10 minut, tento pokus nebyl detailně vyhodnocován, byla pouze vybrána varianta, u které již nedošlo ke kontaminaci explantátů a ty nebyly nijak významně viditelně poškozeny.

Příprava explantátů: odebrané listy byly nejprve desinfikovány v 20% roztoku přípravku SAVO se smáčedlem po dobu 10 minut a poté 3x promyty sterilní destilovanou vodou po dobu 15 minut pro odstranění zbytků desinfekčního činidla. Sterilní listy byly ve flowboxu dále skalpelem zbaveny středové žilky, okrajů poškozených při desinfekci a rozřezány na požadovanou velikost, tzn. na zhruba 1 x 1 cm velké segmenty. Jeden list tak stačil pro přípravu 4 - 6 explantátů.

4.3.1. Použití rostlinného materiálu získaného organogenezí *in-vitro*

Jelikož třetí pokus byl založen v době po odkvětu výchozích rostlin, bylo nutné zajistit jiný zdroj explantátů. K tomuto účelu výborně posloužily rostliny získané organogenezí v průběhu prvního pokusu. Při odběru explantátů z rostlin pěstovaných *in-vitro* odpadá potřeba desinfekce - rostliny již jsou sterilní. Je ale nutno pracovat velice rychle, rostliny jsou v prostředí *in-vitro* zvyklé na vysokou vlhkost a nemají dokonale vyvinutou vlastní regulaci, což vede k rychlému vadnutí v běžných pracovních podmínkách. Listy dosahují daleko menší velikosti, proto nebyla odstraněna středová žilka, ale pouze skalpelem rozrušen povrch pro lepší kontakt s živným médiem. V tomto případě byl výtěžek explantátů na jeden list pouze 1 - 4 ks.

4.4. Založení a průběh pokusů

Pokusy byly prováděny v plastových petriho miskách o průměru 90mm, obsahujících zhruba 25 ml kultivačního média. Dále byly použity 100 ml erlenmeyerovy baňky a v menší míře zavařovací sklenice o objemu 200 ml se stejným množstvím média. Tyto nádoby sloužily ke kultivaci prýtů získaných organogenezí a k převodu somatických embryí do substrátu.

Z důvodu udržení maximální sterility kultur byly všechny experimenty zakládány ve flowboxu, nástroje, média a laboratorní sklo bylo sterilizováno v autoklávu, v průběhu práce pak desinfikováno technickým ethanolem a nad plamenem kahanu. Explantáty byly desinfikovány roztokem chlornanu sodného (SAVO, 4,7 % NaOCl).

Při samotném zakládání pokusů je nutné minimalizovat dobu manipulace s explantáty a dbát zásad udržení sterilního prostředí a práce v něm (důkladně umyté ruce nebo rukavice, čistý oděv, nejlépe laboratorní, udržování čistoty, atd.). Sterilní list byl ve flowboxu vyjmut z nádoby kde proběhla desinfekce a pak na sterilní petriho misce rozřezán skalpelem na jednotlivé explantáty. Při umisťování explantátů na kultivační médium je nutné dodržet jejich původní polaritu - tedy umístit listový segment jeho spodní stranou na kultivační médium, důležité je též zajistit co největší kontakt explantátu s médiem. Po umístění explantátů na médium byla následně petriho miska zabezpečena PE fólií pro zamezení následné vzdušné kontaminace a snazší manipulaci. Posledním krokem je pak popsání misky a uvedení data založení. V případě zakládání kultur v erlenmeyerových baňkách nebo sklenicích jsou nádoby uzavřeny aluminiovou fólií a následně proužkem PE fólie.

4.4.1. Pokus č.1

První experiment částečně vycházel z pokusů které provedli Jain et al. (2002) - konkrétně využití kombinace IAA a BAP a dozrávání a klíčení embryí na 1/2 MS s 2 % sacharózy. Dále byly přidány varianty obsahující 2,4-D která má známý pozitivní vliv na tvorbu kalusů a průběh somatické embryogeneze. Bylo použito 10 petriho misek po 5 explantátech od každé varianty.

Použité varianty v tomto pokusu (10 misek na variantu):

2,4-D 1 mg. l⁻¹

2,4-D 2 mg. l⁻¹

2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹

BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹

BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA 1,5 mg. l⁻¹

BAP 5 mg. l⁻¹

Experiment probíhal bez použití inkubátoru (bez regulace teploty, pouze v regálu s lineárními zářivkami a nastavenou fotoperiodou 16 hodin světla a 8 hodin tmy, teplota se

pohybovala mezi 18 a 28 °C), kultivace probíhala od založení pokusu do vyhodnocení 8 týdnů (explantáty se vyvíjely pomaleji než bylo očekáváno).

Varianty u nichž proběhla organogeneze byly použity pro namnožení rostlinného materiálu metodou jednonodálních segmentů pro další pokusy.

4.4.2. Pokus č.2

V tomto pokusu byl zkoumán primárně vliv plně kontrolovaných kultivačních podmínek na růst explantátů při použití vybraných variant z pokusu č.1. Experiment probíhal v inkubátoru s nastavenou fotoperiodou 16/8 a teplotou 23 °C v denní a 18 °C v noční fázi. Byly použity 4 petriho misky po 5 explantátech na jednu variantu.

Použité varianty v tomto pokusu (4 misky na variantu):

2,4-D 1 mg. l⁻¹

2,4-D 2 mg. l⁻¹

2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹

BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹

První průběžné vyhodnocení proběhlo po 6 týdnech kultivace a vyhodnocení varianty vhodné pro indukci somatické embryogeneze pak po 11 týdnech od začátku pokusu.

Varianta ve které došlo k organogenezi (BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹) byla použita k dalšímu množení pokusných rostlin. Získané embryogenní kalusy z varianty 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ produkující somatická embrya byly využity pro detailní focení pod binolupou (zvětšení 20x a 40x) a na test ideálního média pro dozrávání a klíčení. Zkoumané varianty v tomto testu byly MS médium s poloviční koncentrací živin a s 2 % sacharózy (doporučeno Jain et al, 2002), MS médium s poloviční koncentrací živin, 2 % sacharózy a bez přidaného agaru (tekuté médium) a plné MS médium. Žádná z pokusných variant neobsahovala RRR. Každý kalus posloužil pro přípravu jedné pokusné misky (celkem 3 misky od každé varianty). Byl rozdělen na zhruba 5 částí, přičemž každá obsahovala minimálně jedno dobře patrné somatické embryo a tyto části byly následně umístěny na pokusná média. Vyhodnocení proběhlo po 5 týdnech kultivace spočítáním klíčících embryí na jednu misku a určením průměru na variantu.

4.4.3. Pokus č.3

Třetí pokus byl finálním pokusem vycházejícím z poznatků z předcházejících pokusů, bylo využito nejvhodnější varianty z pokusu č.2, dále její modifikace , čisté 2,4-D a kontrolní varianty bez RRR. Cílem bylo ověřit nevhodnost čisté 2,4-D, prokázat nutnost přítomnosti RRR pro vývoj explantátů (kontrola) a určit vhodnou kombinaci 2,4-D a BAP pro indukci somatické embryogeneze. U pokusných variant kde došlo k tvorbě embryogenního kalusu a somatické embryogenezi byla vyhodnocena nejvhodnější kombinace z hledisek regenerace embryogenního kalusu, získaného množství somatických embryí a úspěšnosti jejich převodu do substrátu.

Pokus opět probíhal v inkubátoru s fotoperiodou 16/8 a teplotou 18 °C v noci a 23 °C ve dne.

Použité varianty v tomto pokusu (výchozí počet 18 misek na variantu):

Kontrola

2,4-D 1 mg. l⁻¹

2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹

2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹

Kultivace na MS médiu obsahujícím RRR probíhala 11 týdnů, pak byly explantáty převedeny na médium pro dozrávání a klíčení (1/2 MS s 2 % sacharózy) - část byla rozdělena na jednotlivá embrya (6 kalusů od každé varianty) a zbytek byl ponechán v původním stavu.

Nerozdělené kalusy byly pěstovány 6 týdnů na klíčicím médiu pro vyzrání, následně byly rozděleny a byl statisticky vyhodnocen počet somatických embryí a počet klíčících somatických embryí připadající na jeden kalus. Stejně byl vyhodnocen počet v předem rozdělených kalusech a následně množství klíčících embryí po 3 a 8 týdnech.

4.4.4. Převod somatických embryí do substrátu

V této fázi byla izolovaná klíčící somatická embrya z pokusu č. 3 převáděna do výsevního substrátu (substrát pro výsevy a množení : perlit, 3 : 1) a následně do podmínek *ex-vitro*. 200 ml zavařovací sklenice byly naplněny z 1/3 substrátem, optimálně zavlaženy a částečně sterilizovány v mikrovlnné troubě (800W, 2 min). Po ochlazení byla do tohoto substrátu převedena somatická embrya na různých stupních vývoje (po 3, 6 a 9 týdnech kultivace na 1/2 MS s 2 % sacharózy). Byla převáděna embrya tvořící v tu chvíli pouze kořen,

kořen a náznak nadzemní části a nebo kořen a zřetelně vyvinutý a rostoucí prýt se základy listů. Toto rozdělení nesouhlasí s uvedenými termíny převodu, jelikož individuální vývoj embryí neprobíhal stejnou rychlostí. Obecně byla vybírána embrya, která vizuálně vykazovala nejvíce vitální růst. Z důvodu nedokonalé sterilizace byl po převodu embryí aplikován fungicidní přípravek Previcur v koncentraci 0,15 %. Cílem tohoto pokusu bylo primárně určení optimální fáze růstu zárodků pro převod do substrátu a podmínek *ex-vitro*.

Vyhodnocení počtu úspěšně převedených somatických embryí pokračujících v růstu proběhlo po 8 týdnech od prvního převodu.

4.5. Metodika zpracování výsledků

Většina pokusů byla vyhodnocena použitím aritmetických průměrů a procent. V případně porovnávání embryogenních variant ve třetím pokusu bylo využito statistiky. Pro statistické zpracování dat byl použit program STATISTICA 12. Při vyhodnocení dat byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) při hladině významnosti $p = 0,05$ a pro zjištění detailnějších výsledků, včetně rozčlenění do homogenních skupin, byl využit Duncanův test.

5. Výsledky

5.1. Výsledky jednotlivých variant a postupů

5.1.1. Desinfekce explantátů

V tomto pokusu byla testována nejvhodnější koncentrace desinfekčního přípravku SAVO pro sterilizaci listů, které posloužily jako zdroj explantátů. Nejlepší se ukázalo použití 20% roztoku přípravku SAVO s destilovanou vodou a několika kapkami smáčedla při působení po dobu 10 minut. Varianta 10 % a 10 minut se ukázala nedostatečně efektivní, naopak 20 minut působení již viditelně poškodilo listy a to i při použití 10 % koncentrace přípravku.

5.1.2. Pokus č.1

V prvním pokusu nebylo u žádného explantátu dosaženo somatické embryogeneze ani tvorby embryogenního kalusu.

Vyhodnocení jednotlivých variant:

2,4-D 1 mg. l⁻¹ - část explantátů vůbec na RRR nereagovala a odumřela po prvních týdnech kultivace, zbytek (72 %) vykazoval známky růstu a prostorových deformací, další regenerace cestou organogeneze nebo somatické embryogeneze ovšem již neproběhla a všechny explantáty odumřely do 8 týdnů od založení pokusu (obr. 6, strana 35).

2,4-D 2 mg. l⁻¹ - tato varianta reagovala velice podobně jako předešlá, ale regenerace a známky růstu byly pozorovatelné pouze u 55 % explantátů. Všechny bez dalšího vývoje odumřely do 8 týdnů od založení (obr. 7, strana 35).

2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ - v tomto případě reagovalo a začalo tvořit kalus 100 % explantátů, následná regenerace již ale neproběhla a explantáty buď odumřely nebo přestaly růst (obr. 8, strana 35).

BAP 5 mg. l⁻¹ - při použití samotného BAP v této koncentraci byla reakce explantátů a jejich další růst patrný ve 100 % případech, většina explantátů poté odumřela bez následné regenerace, ovšem 32,5 % explantátů regenerovalo organogenezi a získané prýty posloužily po převodu na čisté MS médium jako další zdroj pokusného materiálu (obr. 9, strana 35).

BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹ - 100 % explantátů reagovalo na RRR zbytněním a růstem kalusů, v 11,11 % případech následně došlo k organogenezi, ostatní explantáty odumřely nebo nebyl pozorován další vývoj. Prýty získané organogenezi byly pasážovány na čisté MS médium pro další množení (obr. 10, strana 36).

BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA 1,5 mg. l⁻¹ - všechny explantáty regenerovaly (100 %), u 96 % následně došlo k organogenezi a získané prýty byly dále kultivovány na čistém MS médiu (obr. 11, strana 36).

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)			Regenerace explantátů			
IAA	2,4-D	BAP	Regenerace a tvorba kalusu (%)	Embryogenní kalus (%)	Další vývoj explantátů	Regenerace prýtů (%)
-	1,0	-	72	0	negativní	0
-	2,0	-	55	0	negativní	0
-	1,0	0,5	100	0	negativní	0
-	-	5,0	100	0	organogeneze	32,50
0,5	-	1,5	100	0	organogeneze	11,11
1,5	-	5,0	100	0	organogeneze	96,00

obr. 6 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



obr. 7 MS + 2,4-D 2 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



obr. 8 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



obr. 9 MS + BAP 5 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



obr. 10 MS + BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA
0,5 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



obr. 11 MS + BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA
1,5 mg. l⁻¹, 8 týdnů od založení



5.1.3. Pokus č.2

V tomto pokusu byl prokázán významný vliv fyzikálních podmínek kultivace na indukci somatické embryogeneze (konkrétně teploty). Bylo jí dosaženo u varianty 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ (médium bylo identické jako v pokusu č.1 - pocházelo ze stejné várky).

Vyhodnocení jednotlivých variant:

2,4-D 1 mg. l⁻¹ - v tomto případě regenerovalo menší množství explantátů než v pokusu č.1 a to pouze 25 %, většina explantátů odumřela již po 6 týdnech kultivace, zbytek následoval během dalších tří týdnů (obr. 12, strana 37).

2,4-D 2 mg. l⁻¹ - Tato varianta vykazovala nejnižší regeneraci a tvorby kalusu z celého pokusu (pouze 5 %), všechny explantáty odumřely do 6 týdnů od založení (obr. 13, strana 37).

2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ - kombinace 2,4-D a BAP úspěšně indukovala tvorbu embryogenního kalusu a somatickou embryogenezi u 100 % explantátů. Po 6 týdnech byla patrná tvorba embryogenního kalusu na všech explantátech, při finálním vyhodnocení bylo zjištěno, že na 100 % kalusů dochází k somatické embryogenezi. Tato varianta následně posloužila k testu vhodného média pro dozrávání a klíčení somatických embryí (obr. 15 - 20, strana 38 - 39).

BAP 1,5 mg.l⁻¹ + IAA 0,5 mg.l⁻¹ - 100 % explantátů reagovalo a tvořilo kalus, u 85 % z nich následně po 4-5 týdnech nastala organogeneze, prýty byly pasážovány na čisté MS, ale pro vitifikaci byly následně vyřazeny (obr. 14, strana 38).

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)			Regenerace explantátů			
IAA	2,4-D	BAP	Regenerace a tvorba kalusu (%)	Embryogenní kalus (%)	Další vývoj explantátů	Regenerace prýtů a somatických embryí (%)
-	1,0	-	25	0	negativní	0
-	2,0	-	5	0	negativní	0
-	1,0	0,5	100	100	somatická embryogeneze	100
0,5	-	1,5	100	0	organogeneze	85

obr. 12 MS 2,4-D 1 mg. l⁻¹, po 6 týdnech kultivace



obr. 13 MS 2,4-D 2 mg. l⁻¹, po 6 týdnech kultivace



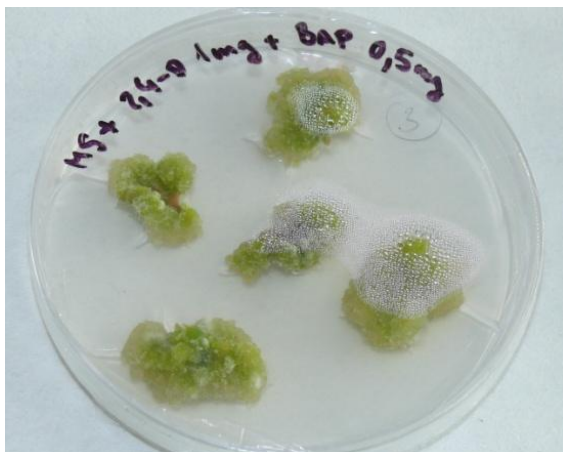
obr. 14 MS + BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA
0,5 mg. l⁻¹, po 6 týdnech kultivace



obr. 15 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, po 6 týdnech kultivace



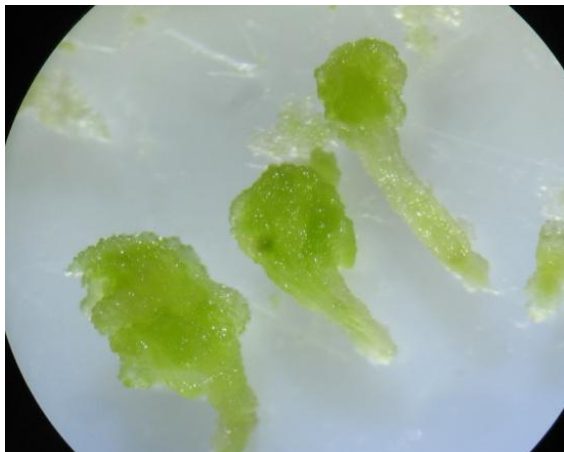
obr. 16 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, po 11 týdnech kultivace



obr. 17 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, klíčící somatické embryo po
11 týdnech kultivace (20x)



obr. 18 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, 3 izolovaná klíčící embrya v
buněčném obalu (20x),



obr. 19 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, srovnání velikosti klíčících
embryí v buněčném obalu a bez něj
(20x)



obr. 20 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, klíčící embryo zbavené
buněčného obalu (20x),



V testu klíčících médií nejlépe vyšlo 1/2 MS + 2 % sacharózy s průměrem 3,5 klíčících embryí na jednu pokusnou petriho misku po 5 týdnech, na klasickém MS médiu klíčilo 2,32 a na tekutém 1/2 MS + 2 % sacharózy pouze 0,32, tekuté médium v petriho miskách bylo nevhodné k manipulaci a vykazovalo vysokou náchylnost ke kontaminacím.

Varianta klíčícího média	Průměrný počet klíčících embryí na 1 miskou po 5 týdnech
MS + 3 % sacharózy	2,32
1/2 MS + 2 % sacharózy	3,50
1/2 MS + 2 % sacharózy tekuté	0,32

5.1.4. Pokus č.3

Ve finálním pokusu bylo dosaženo somatické embryogeneze u 3 pokusných variant, 2 z nich byly efektivní a byl u nich proveden převod klíčících embryí do substrátu (popsáno v následující kapitole). Zbývající varianta nebyla dále zkoumána, jelikož byl získán pouze jeden embryogenní kalus s probíhající somatickou embryogenezí z výchozího počtu 90 explantátů.

Vyhodnocení jednotlivých variant:

Kontrola - nedošlo k regeneraci u žádného z explantátů (0 %), všechny listové segmenty odumřely zhruba do 4 týdnů od založení pokusů (obr. 21, strana 41).

2,4-D 1 mg.l⁻¹ - v této variantě proběhla regenerace a tvorba kalusu u 13,33 % explantátů, 3,33 % vytvořilo embryogenní kalus a u 1,11 % explantátů proběhla somatická embryogeneze. V tomto kalusu byl po 6 týdnech na 1/2 MS + 2 % sacharózy stanoven počet somatických embryí (17 z toho 14 klíčících) a dále nebyl z důvodu ojedinělosti zkoumán (obr. 22, strana 41).

2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ - regenerace a tvorba embryogenního kalusu proběhla u této varianty ve 100 % případů, stejně tak jako tvorba somatických embryí. Po 6 týdnech na 1/2 MS + 2 % sacharózy bylo v nerozdělených kalusech napočítáno $27,09 \pm 14,84$ somatických embryí, z nichž $1,02 \pm 1,16$ již klíčilo. Somatických embryí kultivovaných na 1/2 MS + 2 % sacharózy samostatně (průměrně na kalus $22,67 \pm 8,36$) vyklíčilo po 3 týdnech $5,17 \pm 2,71$ a po 8 týdnech $7,33 \pm 2,25$ (obr. 23, 27, 29, strana 42, 44).

2,4-D 2 mg.l⁻¹ + BAP 0,5 mg.l⁻¹ - u této modifikace předchozí varianty byla regenerace patrná také u 100 % explantátů, ale tvorby embryogenního kalusu a samotné somatické embryogeneze bylo dosaženo pouze u 94,94 % explantátů. Z kalusů kultivovaných vcelku 6 týdnů na 1/2 MS + 2 % sacharózy bylo izolováno $17,56 \pm 9,77$ somatických embryí, z nichž $0,23 \pm 0,51$ již klíčilo. V případě somatických embryí pěstovaných samostatně bylo na jeden kalus napočítáno $22,83 \pm 8,42$, po 3 týdnech klíčilo $12,17 \pm 6,08$ a po 8 týdnech $14,4 \pm 6,31$ embryí (obr. 24, 28, 30, strana 42, 44).

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)		Regenerace explantátů			
2,4-D	BAP	Regenerace a tvorba kalusu (%)	Embryogenní kalus (%)	Další vývoj explantátů	Tvorba somatických embryí (%)
-	-	0	0	negativní	0
1,0	-	13,33	3,33	somatická embryogeneze	1,11
1,0	0,5	100	100	somatická embryogeneze	100
2,0	0,5	100	94,94	somatická embryogeneze	94,94

obr. 21 Kontrola, odumřelé explantáty
po 4 týdnech kultivace



obr. 22 MS + 2,4-D 1 mg.l⁻¹, jediný
embryogenní kalus, 11 týdnů kultivace



obr. 23 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, 11 týdnů kultivace



obr. 24 MS + 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP
0,5 mg. l⁻¹, 11 týdnů kultivace



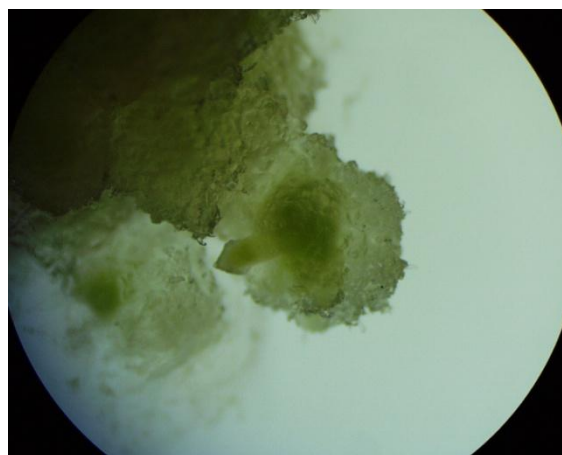
V následující tabulce je uvedeno množství somatických embryí získaných z jednoho kalusu, u první varianty (2,4-D 1 mg. l⁻¹) je uveden přímo konkrétní počet, protože byl k dispozici pouze jeden embryogenní kalus. Tyto výsledky byly zjištěny na kalusech kultivovaných vcelku na 1/2 MS + 2 % sacharózy. Ze statistického vyhodnocení počtu získaných somatických embryí na jeden kalus vyplývá, že obě hlavní varianty (2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ a 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹) lze použít se stejnou úspěšností.

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)		Vyhodnocení somatických embryí	
2,4-D	BAP	Počet somatických embryí na jeden kalus	Počet klíčících somatických embryí po 6 týdnech na jeden kalus
1,0	-	17,00 a	14,00 b
1,0	0,5	27,09 ± 14,84 a	1,02 ± 1,16 a
2,0	0,5	17,56 ± 9,77 a	0,23 ± 0,51 a

obr. 25 somatická embrya na povrchu embryogenního kalusu (20x)



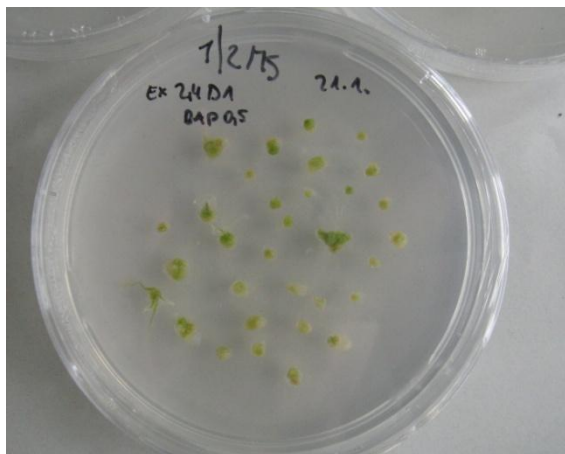
obr. 26 klíčící somatické embryo na povrchu embryogenního kalusu (20x)



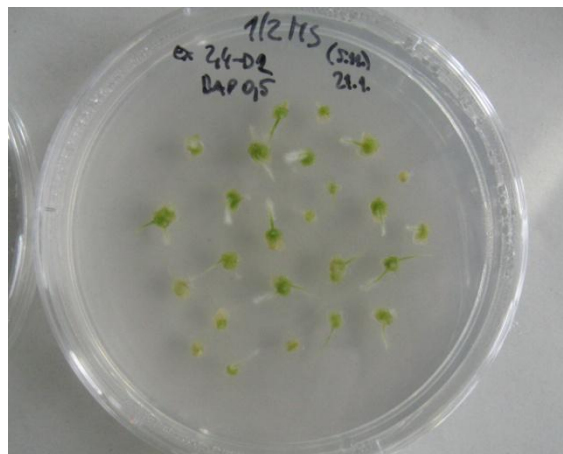
Vyhodnocení kultivace izolovaných somatických embryí a jejich klíčení je zpracováno v další tabulce, odlišnosti v průměrném množství somatických embryí na jeden kalus oproti předchozí tabulce jsou způsobeny výběrem kalusů - cílem byl výběr co nejpodobnějších z důvodu homogenizace obou variant pro lepší rozpoznání odlišností v klíčení somatických embryí. Jako vhodnější byla statisticky vybrána varianta 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, u které vyklíčilo 2,35krát a 1,96krát více embryí při takřka shodném výchozím počtu.

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)		Vyhodnocení somatických embryí		
2,4-D	BAP	Počet somatických embryí na jeden kalus	Počet somatických embryí klíčících po 3 týdnech	Počet somatických embryí klíčících po 8 týdnech
1,0	0,5	22,67 ± 8,36 a	5,17 ± 2,71 a	7,33 ± 2,25 a
2,0	0,5	22,83 ± 8,42 a	12,17 ± 6,08 b	14,40 ± 6,31 b

obr. 27 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, samostatně kultivovaná embrya po 3 týdnech na médiu pro dozrávání a klíčení



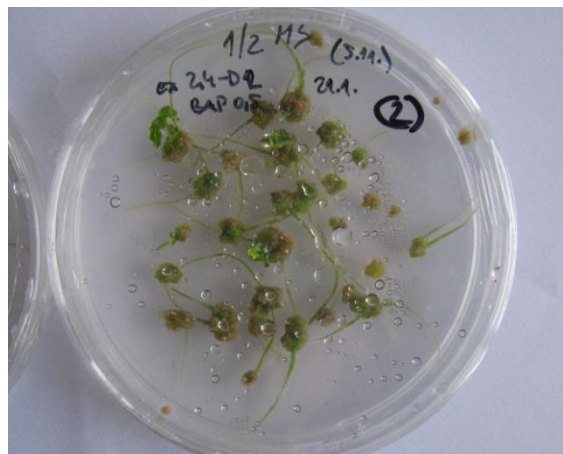
obr. 28 MS + 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, samostatně kultivovaná embrya po 3 týdnech na médiu pro dozrávání a klíčení



obr. 29 MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, samostatně kultivovaná embrya po 8 týdnech na médiu pro dozrávání a klíčení



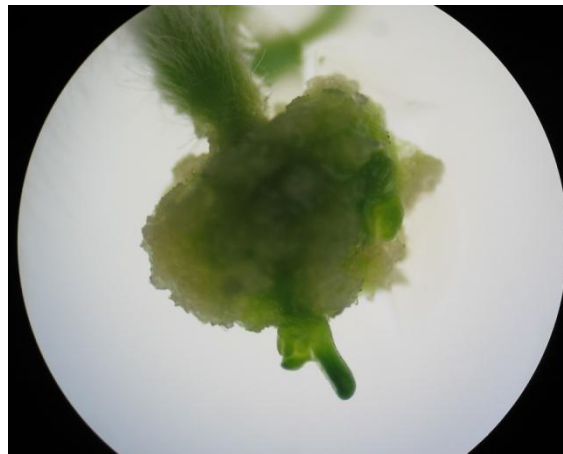
obr. 30 MS + 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, samostatně kultivovaná embrya po 8 týdnech na médiu pro dozrávání a klíčení



obr. 31 klíčící somatické embryo na 1/2 MS + 2 % sacharózy (20x)



obr. 32 klíčící somatické embryo na 1/2 MS + 2 % sacharózy, ve spodní části je patrné prorůstání základu listů a prýtu buněčným obalem (40x)



5.1.5. Převod somatických embryí do substrátu

Bylo zjištěno, že úspěšný převod somatických embryí do substrátu je silně závislý na stupni jejich vývoje. Embrya převáděná po 3 týdnech kultivace na 1/2 MS + 2 % sacharózy tvořila kořeny dlouhé od 1 do 3 cm, avšak viditelná budoucí nadzemní část ještě nebyla vytvořena. Z těchto somatických embryí se nepodařilo získat ani jednu rostlinu. Při převodech po 6 a 9 týdnech byla do substrátu převáděna z části již embrya tvořící základy listů a prýtu, zbytek pak představovala embrya na nižších stupních vývoje. Při vyhodnocení bylo potvrzeno, že rostliny úspěšně zvládnou převod až ve fázi prorůstání nadzemní části. Embrya tvořící v době převodu do substrátu dobře znatelný prýt a listy se uchytily se 100% úspěšností. Embrya, která vytvořila před převodem pouze náznaky nadzemní části, ve vývoji nadále nepokračovala a stagnovala. V této práci jsou tedy uvedena jako neuchycená. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při použití varianty 2,4-D $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ + BAP $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a převodu po 9 týdnech kultivace na médiu pro dozrávání a klíčení (úspěšnost 50 %). Z důvodu lepšího klíčení a tedy většího množství embryí potenciálně vhodných k převodu bylo ovšem získáno více rostlin z varianty 2,4-D $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ + BAP $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ převáděné po 9 týdnech (úspěšnost byla 40%).

V této tabulce je v procentech uvedeno množství somatických embryí, která se po převodu uchytila a dále pokračovala v růstu.

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)		Délka kultivace na 1/2 MS + 2 % sacharózy		
2,4-D	BAP	3 týdny	6 týdnů	9 týdnů
1,0	0,5	0 %	0 %	50 %
2,0	0,5	0 %	30 %	40 %

obr. 33 úspěšně převedené rostliny získané z varianty MS + 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹



obr. 34 úspěšně převedené rostliny získané z varianty MS + 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹



Na následující straně jsou uvedeny přesné počty převedených a uchycených embryí, je dobře patrné, že z varianty 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ bylo i přes nižší procento přežití při převodu po 9 týdnech získáno více rostlin. Úspěšně převedené rostliny z obou variant nevykazovaly žádné vizuální ani růstové rozdíly.

Regulátory rostlinného růstu (mg. l ⁻¹)		3 týdny na 1/2 MS + 2 % sacharózy		6 týdnů na 1/2 MS + 2 % sacharózy		9 týdnů na 1/2 MS + 2 % sacharózy	
2,4-D	BAP	Převedeno	Počet získaných rostlin	Převedeno	Počet získaných rostlin	Převedeno	Počet získaných rostlin
1,0	0,5	4	0	6	0	4	2
		5	0	-	-	8	4
2,0	0,5	6	0	10	3	5	2
		5	0	-	-	8	1
		-	-	-	-	10	4
		-	-	-	-	7	5

obr. 35 rostlina schopná převodu do polních podmínek



6. Diskuse

Desinfekce explantátů

Desinfekce explantátů pomocí 20% roztoku přípravku SAVO (se smáčedlem), který obsahuje 4,7 % NaClO, se rovná použití 0,94% koncentrace čistého NaClO. To odpovídá doporučené horní hranici koncentrace roztoku NaClO použité Matiskou (2009) při sterilizaci listů u *Phlox paniculata*. Také desinfekce po dobu 20 minut se shoduje s horní hranicí doporučeného působení (Matiska (2009) doporučuje koncentraci 0,5 -1,0 % NaClO působící 10-20 minut). Declerck and Korban (1995) uvádí pro desinfekci listů *Phlox paniculata* jako dostačující koncentraci 0,43 % NaClO s 1 % detergentu Tween-20 při působení 10 minut. Následné promývání sterilní destilovanou vodou je společné pro všechny postupy. Tato varianta je na spodní hranici doporučení Matisky (2009) a v provedeném pokusu zhruba odpovídá variantě 10 % přípravku SAVO působící 10 minut, která se jevila jako nedostatečná.

Jain et al. (2002) použili detergent Teepol (Qualigen, Indie) v koncentraci 1 % (působení 5 minut) a následně desinfekční činidlo chlorid rtuťnatý (HgCl₂, 0,1 %, 15 minut), z důvodu použití jiného činidla zde tedy srovnání není možné.

Založení pokusů, složení médií, vývoj kultur

Použití MS média jako základní živné půdy pro explantáty *Phlox paniculata* se shoduje se všemi nalezenými pracemi studujícími *in-vitro* kultury tohoto druhu (Declerck and Korban, 1995; Jain et al. 2002; Matiska, 2009). Také koncentrace sacharózy 3 % je všeobecně doporučována.

Kombinace a jednotlivé RRR v prvním pokusu vycházely primárně z práce, kterou vypracovali Jain et al. (2002) a z poznatků, které publikoval Matiska (2009). Jain et al. (2002) nespécifikovali použitou odrůdu, případně zda použili botanický druh, Matiska (2009) zkoumal odrůd několik a mezi nimi i odrůdu 'Fujiyama' použitou v této práci. Problematika odlišné reakce na RRR u různých odrůd stejného druhu je dobře známa, některé odrůdy *Phlox paniculata* se také značně blíží druhu *Phlox maculata* použitému ve šlechtění a tím se jejich reakce také značně odlišuje. Rozdílnou reakci různých odrůd plamének svými pokusy potvrzují Matiska (2009) a Declerck and Korban (1995). Jain et al. (2002) použili kombinaci BAP a IAA pro iniciaci tvorby kalusu (nejvhodnější kombinace byla BAP 0,5 mg. l⁻¹ + IAA

2,0 mg. l⁻¹), následně indukovali somatickou embryogenezi přenesením získaných kalusů na médium obsahující stejné RRR, ale v přibližně opačné koncentraci (ideální se ukázala kombinace BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹). Dozrávání a klíčení somatických embryí pak proběhlo na 1/2 MS s 2 % sacharózy. Matiska (2009) ovšem svými pokusy zjistil, že varianta BAP 0,5 mg. l⁻¹ + IAA 2,0 mg. l⁻¹ u *Phlox paniculata* indukuje tvorbu kalusu velice špatně (hodnocena jako špatná, spíše nepatrná). Nejlepších výsledků dosáhl při použití 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,2 mg. l⁻¹ a samotné 2,4-D 1 mg. l⁻¹, v těchto případech byl embryogenní kalus s probíhající somatickou embryogenezi získán již na výchozím médiu bez přesunu na médium opačného složení RRR. Použité varianty v prvním pokusu této práce byly tedy čisté 2,4-D (1 mg. l⁻¹ a 2 mg. l⁻¹, varianta se 2 mg je pouze pokusnou modifikací té první), 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ (upravená nejlepší varianta podle Matisky (2009)), BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹ (kombinace, kterou použili pro samotnou indukci somatické embryogeneze Jain et al. (2002)), BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA 1,5 mg. l⁻¹ (modifikovaná kombinace vycházející z Jain et al. (2002)) a pouze s BAP, konkrétně BAP 5 mg. l⁻¹ jakožto protiklad k čisté 2,4-D. Kultury odvozené od Jain et al. (2002) regenerovaly organogenezi, což přímo odpovídá závěrům, které publikovali Skoog and Miller (1957) - kombinace, ve které výrazně převládá cytokinin nad auxinem, vede k regeneraci prýtlů. Větší efektivitu organogeneze u varianty BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA 1,5 mg. l⁻¹ lze pravděpodobně vysvětlit vyšší koncentrací RRR oproti BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹ (poměr RRR je zhruba stejný). Varianta BAP 5 mg. l⁻¹ vycházela z kombinace BAP 5 mg. l⁻¹ + IAA 0,1 mg. l⁻¹, kterou použil Matiska (2009) při zkoumání multiplikace. Tato varianta reagovala organogenezi i po vynechání auxinu, ale s menší efektivitou.

Jak již bylo uvedeno ve výsledcích, somatické embryogeneze v tomto pokusu nebylo dosaženo pravděpodobně vinou nevhodných teplotních podmínek. Tuto hypotézu potvrzuje fakt, že ve druhém pokusu byl využit inkubátor a při aplikaci varianty 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ byla indukována somatická embryogeneze ve 100 % případů. V rozporu s výsledky, které publikoval Matiska (2009), je vyvolání somatické embryogeneze pouze samotným 2,4-D. V této práci se takto podařilo získat pouze jediný embryogenní kalus ze všech provedených pokusů a to i přes použití médií z několika várek a několika zásobních roztoků 2,4-D. V embryogenních kalusech získaných z varianty 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ byla probíhající somatická embryogeneze definitivně potvrzena rozborem a detailním zkoumáním pod binolupou (20x a 40x zvětšení), kdyby byla izolována jednotlivá somatická

embrya na různých stupních vývoje. Vznikající somatická embrya a celé embryogenní kalusy odpovídaly popisům, které uvedli Jain et al. (2002) a Matiska (2009). Při testu vhodnosti médií pro dozrávání a klíčení embryí bylo potvrzeno jako nejlepší 1/2 MS s 2 % sacharózy (tuto kombinaci také doporučují Jain et al. (2002) a Rout et al. (2000)), naopak jako naprosto nevhodné se ukázalo použití stejného média v kapalně formě. Kombinace BAP 1,5 mg. l⁻¹ + IAA 0,5 mg. l⁻¹ regenerovala organogenezi, ale v tomto případě byly všechny získané rostliny vitrifikované. Tuto kombinaci proto pro množení organogenezi nelze doporučit.

Při tomto pokusu byla také pozorována a potvrzena vysoká regenerační schopnost u *Phlox paniculata*. Tato vlastnost, která může množení plamének značně usnadnit, ale také komplikovat vyhodnocování pokusů, spočívá ve značné regeneraci z kořenů (množení kořenovými řízků popisuje například Böhm (1991)). Bylo pozorováno, že klíčící somatická embrya mohou obrážet z kořenů, což je způsobeno buď mechanickým poškozením a nebo pravděpodobně problémem s prorůstáním listů a prýtu parenchymatickým obalem samotného embrya. Stejně tak bylo pozorováno prorůstání více prýtů a kořenů způsobené pravděpodobně poškozením primárního zárodku. Druhou možností pak je klíčení více embryí, která byla při převodu chybně určena jako jedno.

Ve finálním pokusu byla zařazena kontrola, kterou bylo potvrzeno, že bez přítomnosti RRR na kultivačním médiu všechny explantáty (listové segmenty) odumřely bez viditelné reakce maximálně po 4 týdnech kultivace. Dále byla opět použita varianta 2,4-D 1 mg. l⁻¹ pro definitivní potvrzení její nevhodnosti. Z výchozího počtu 90 explantátů na ní regenerovalo jen 13,33 %, strukturu embryogenního kalusu vytvořilo pouze 3,33 % a k samotné somatické embryogenezi došlo pouze u jediného explantátu (úspěšnost 1,11 %). Matiska (2009) dosáhl u této varianty úspěšnosti 33,30 %, ale i přes všechna opakování se v této práci takovému výsledku nepodařilo přiblížit. Počet 17 získaných somatických embryí na jeden kalus se od průměrů ostatních variant příliš nelišil, ale celkově vychází z těchto pokusů použití samotné 2,4-D jako naprosto nevhodné.

Hlavním cílem finálního pokusu bylo porovnání variant 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ a 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ z několika samostatných hledisek a odvození té nejlepší. V první fázi byla hodnocena frekvence indukce somatické embryogeneze a následně byl statisticky vyhodnocen počet somatických embryí na jeden kalus. V případě 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ byl indukován embryogenní kalus a somatická embryogeneze ve 100 % případech, obdobná varianta publikovaná Matiskou (2009) iniciovala somatickou

embryogenezi u stejné odrůdy pouze ve 46,7 % případech, lepší dosažený výsledek může tedy být způsoben zvýšením koncentrace BAP z 0,2 mg. l⁻¹ na 0,5 mg. l⁻¹. Jen o málo horších výsledků dosáhla modifikovaná varianta 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹, somatická embryogeneze zde nastala v 94,94 %. Tento rozdíl je natolik malý, že v praxi pravděpodobně nemá význam. Počet somatických embryí na jeden kalus byl zpracován statisticky (viz. metodika zpracování výsledků) a z výsledků vyplývá, že obě varianty jsou v praxi použitelné stejně. V této fázi bylo také potvrzeno, že pro klíčení a další růst embryí je nutné je na vhodném médiu (1/2 MS + 2 % sacharózy) kultivovat odděleně, jelikož na nerozdělených kalusech klíčilo po 6 týdnech průměrně pouze 1,02 a 0,23 embryí. Tento poznatek se shoduje s postupem, který publikovali Jain et al. (2002).

Ve druhé fázi byly zkoumány rozdíly ve vyžrávání a klíčení separovaných somatických embryí z obou hlavních variant při kultivaci na 1/2 MS + 2 % sacharózy. Od každé varianty bylo vybráno 6 podobných kalusů, záměrem bylo kultivovat od obou variant zhruba stejné množství embryí pro lepší rozpoznání a vyhodnocení růstových charakteristik. Vyhodnocení počtů klíčících embryí proběhlo po 3 a 8 týdnech kultivace na 1/2 MS + 2 % sacharózy. Jain et al. (2002) uvádějí jako čas potřebný k vyklíčení 70-75 % embryí pouze 2 týdny. V tomto pokusu bylo dosaženo po 3 týdnech vyklíčení 22,8 % (2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹) a 53,3 % (2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹) embryí. Po dalších 5 týdnech kultivace se tyto hodnoty zvedly na 32,33 % v prvním a 63 % v druhém případě. Důvod natolik odlišných výsledků spočívá pravděpodobně v použití jiného postupu a RRR, případně v kultivaci jiné odrůdy, rozdílné časové intervaly pak provází celou práci, všechny realizované pokusy vyžadovaly delší kultivaci než uvádí Jain et al. (2002) i Matiska (2009). Kultivací separovaných somatických embryí bylo prokázáno, že použití varianty 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ je výhodnější, neboť z ní byl získán takřka dvojnásobný počet klíčících embryí.

Poslední praktickou částí práce bylo experimentální ověření nejvhodnější fáze růstu klíčících somatických embryí pro převod do substrátu. Bylo jasně prokázáno, že převod do substrátu úspěšně zvládnou pouze embrya s dostatečně vyvinutým kořenem a základem prýtu s listy. Úspěšnost uchycení a dalšího růstu byla v tomto případě 100% bez ohledu na variantu. Tento poznatek odpovídá fotodokumentaci, kterou uvedli Jain et al. (2002). Celkové množství uchycených rostlin po 9 týdnech kultivace na 1/2 MS + 2 % sacharózy vztažené k výchozímu počtu embryí se příliš neliší (50 a 40 %), větší úspěšnost varianty 2,4-D 2

mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ při převodu po 6 týdnech (30 % uchycených oproti 0 %) je dána pravděpodobně větším počtem klíčících embryí ze kterých se vybíralo. Právě díky výrazně lepší klíčivosti somatických embryí bylo při použití této varianty získáno 11 rostlin, z druhé pouze 6.

7. Závěr

- Bylo prokázáno, že indukce somatické embryogeneze je kromě vhodné kombinace regulátorů rostlinného růstu v kultivačním médiu také významně závislá na kultivačních podmínkách, jelikož při použití stejné varianty (2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹) byla indukována pouze v plně kontrolovaných podmínkách inkubátoru. Bez přesně definovaného teplotního režimu se nepodařilo získat ani jeden embryogenní kalus.
- Pro indukci somatické embryogeneze byla jako nejlepší stanovena kombinace auxinu 2,4-D a cytokininu BAP.
- Pro iniciaci tvorby embryogenního kalusu jsou shodně použitelné varianty 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ a 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹. Také produkce somatických embryí byla statisticky vyhodnocena jako srovnatelná.
- Rozdíl mezi variantami nastal ve fázi dozrávání a klíčení somatických embryí na 1/2 MS + 2 % sacharózy. V případě 2,4-D 2 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ vyklíčilo po 6 týdnech 2,35krát a po 8 týdnech 1,96krát více embryí než na 2,4-D 1 mg. l⁻¹ + BAP 0,5 mg. l⁻¹ a díky tomu bylo z této varianty získáno více rostlin.
- Bylo potvrzeno, že převod do substrátu a nesterilních podmínek je možný až u embryí vyklíčených v kompletní rostlinku se zřetelně vyvinutou kořenovou částí i prýtem s listy.
- V závislosti na dosažených výsledcích a komplikovaném postupu tuto metodu rozmnožování u *Phlox paniculata* nelze pro komerční pěstování doporučit. Může ovšem nacházet široké uplatnění ve šlechtitelství díky genetické stabilitě, jelikož somatické embryo má původ v jediné buňce.

8. Seznam literatury

- Anonym. *Phlox paniculata* 'Mount Fuji'. Missouri Botanical Garden [online]. [cit. 2015-02-17]. Dostupné z <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=e600>.
- Böhm, Č. 1991. Trvalky: ozdoba zahrady i bytu. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha, 112 s. ISB: 8085362066
- Decklerk, V., Korban, S. S. 1995. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata* L. Journal of Plant Physiology. 147. p. 441 – 446
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50 (1). p. 151 – 158
- Golovkin, B. N., Kliková, G. a kol. 1990. Trvalky: rozkvetlá zahrada (1). Lidové nakladatelství. Praha. 352 s. ISBN: 8070220538
- Gopi, C., Ponmurugan, P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. Journal of Biotechnology. 126. p. 260 – 264
- Hertle, B., Kiermeier, P., Nickigová, M. 2000. Zahradní květiny. 3. české vydání. JAN VAŠUT. Praha. 239 s. ISBN: 8072360345
- Jain, A., Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. Scientia Horticulturae. 94. p. 137 – 143
- Jha, T. B., Gosh, B. 2005. Plant Tissue Culture: Basic and Applied. Universities Press. New Delhi. p. 206. ISBN: 8173714886
- Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae. 110. p. 340 – 344
- Kováč, J. 1995. Explantátové kultury rostlin. UPOL. Olomouc. 140 s. ISBN: 8070674938

- Kutina, J. 1988. Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví. 2. vydání. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 416 s. ISBN: 0702888
- Manrique-Trujillo, S., Díaz, D., Reano, R., Ghislain, M., Kreuze, J. 2013. Sweetpotato plant regeneration via an improved somatic embryogenesis protocol. *Scientia Horticulturae*. 161. p. 95 – 100
- Matiska, P. 2009. Využití metod *in vitro* pro získání výchozích šlechtitelských materiálů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.). Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 199 s.
- Moore, T. C. 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag New York Inc. New York. p. 274. ISBN: 0387904018
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15. p. 473 – 497
- Neumann, K. H., Kumar, A., Imani, J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application*. Springer-Verlag. Berlin. p. 333. ISBN: 9783540938828
- Novák, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia. Praha. 208 s. ISBN: 8020003444
- Novák, J., Skalický, M. 2012. *Botanika: cytologie, histologie, organologie, systematika*. 3. vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788087415535
- Piovan, A., Canitato, R., Filippini, R. 2014. Somatic embryogenesis and glucosinolate/myrosinase system in vulnerable *Brassica repanda* subsp. *glabrescens* (Poldini) Gómez-Campo. *Scientia Horticulturae*. 172. p. 317 – 324
- Procházka, S., Šebánek, J. a kol. 1997. *Regulátory rostlinného růstu*. Academia. Praha. 380 s. ISBN: 8020005978
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha. 460 s. ISBN: 8020005862
- Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from calus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*. 86 (1). p. 71 – 79

Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50 (1). p. 199 – 204

Skoog, F., Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia Society for Experimental Biology*, 54 (11), p. 118 – 130

Smith, R. H. 2012. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3rd ed. Academia Press. San Diego. 208 p. ISBN: 9780124159204

9. Seznam použitých zkratk

1/2 MS - Murashige and Skoog medium (1962) poloviční koncentrace živin

2,4-D - kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

BAP - 6-benzylaminopurin

IAA - kyselina indolyl-3-octová

MS - Murashige and Skoog medium (1962)

RRR - regulátor rostlinného růstu