

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zahradnictví**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Indukce polyploidních rostlin získaných z listových  
segmentů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.)  
v podmínkách in vitro**

**Bakalářská práce**

**Daniel Buček**

**Obor: Zahradnictví**

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

**© 2022 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Indukce polyploidních rostlin získaných z listových segmentů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.) v podmínkách in vitro“ jsem vypracoval 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 22. 4. 2022

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Pavlu Matiskovi, Ph.D., za vstřícný přístup, obětavé vedení práce a odborné konzultace. Dále děkuji Ing. Ondřeji Šaškovi za neocenitelnou praktickou pomoc v laboratoři a přínosné konzultace a Ing. Janě Trechové za korekturu.

# Indukce polyploidních rostlin získaných z listových segmentů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.) v podmínkách in vitro

## Souhrn

Plamenka latnatá (*Phlox paniculata* L.) je sadovnický významnou trvalkou, vyžadující pro udržení žádoucích genetických znaků vegetativní množení. Metody in vitro jsou proto cenným nástrojem nejen pro její multiplikaci, ozdravení genetického materiálu, ale i pro získávání variabilního výchozího šlechtitelského materiálu metodou indukce tetraploidních rostlin za využití chemomutagenů, kterému se věnuje tato práce.

Ve dvou experimentech byla založena in vitro kultura explantátů listových segmentů hybridů *P. paniculata* L. s pracovními názvy 'P-6' a 'P-14' na plném MS médiu, doplněném o růstové regulátory IAA a TDZ v koncentracích 0,5 a 1,5 mg/l.

Po sedmi dnech regenerace byla kultura převedena na stejné médium, doplněné o antimitotické agensy. V prvním případě oryzalin v koncentracích 10, 20 a 40  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro infiltraci po dobu 7 a 14 dní. Ve druhém případě to byl trifluralin v koncentracích 20, 40, 80 a 160  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  při stejných časových periodách.

Experiment bohužel nebylo možné vyhodnotit na průtokovém cytometru, protože všechny explantáty uhynuly ještě před dokončením experimentu. I přes tuto okolnost se podařilo dospět k částečným výsledkům a závěrům, a to za využití nepřímých metod detekce polyploidů, zaznamenáním chimerismů a morfologických deformací explantátů i prýtů charakteristických pro polyploidii. Tím se alespoň částečně potvrdily předchozí experimenty, které se tato práce snažila ověřit.

**Klíčová slova:** *phlox*, tetraploid, in vitro, oryzalin, trifluralin

# Induction of polyploid plants harvested from the leaf segment in the garden phlox (*Phlox paniculata* L.) under in vitro conditions

## Summary

*Phlox paniculata* L. is from horticultural view important pereny plant, requiring for keeping it's wanted genetical characteristics vegetative multiplication. In vitro methods are there valuable instruments not only for *P. paniculata* L. multiplication, healing of genetic material, but also for getting variable base breeding material by method of tetraploid induction, by using chemomutagenic substances, which is this work dedicated to.

In two experiments were initiated tissue culture from leaf segments harvested out of two hybrids of *Phlox paniculata* L. with work names 'P-6' and 'P-14'. On full MS medium with added growth regulants IAA and TDZ in concentrations 0,5 and 1,5mg per liter of medium.

After seven days of regeneration, explants were transfered to the same medium with added antimitotic agents oryzalin in concentrations 10, 20 a 40  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  for 7 and 14 days periods to infiltrate and in second experiment trifluralin in concentrations 20, 40, 80 a 160  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  for the same time periods.

Unfortunately it was not possible to evaulate the experiment by flow cytometry, because of all explants died before finishing the experiments due to unexpected cultivation enviroment changes. Despite the unfinished evaluation by flow cytometry, it was possible to achieve at least some partial results and conclusions. It was possible by using non-direct methots of polyploid detection and noticing few chimeric and albinic regenerated shots during regeneration after infiltration and several morphologic deformations of explants on regenerated shots observations. We managed to at least partialy confirm previous experiments this work was claiming as its goals.

**Keywords:** *phlox*, tetraployd, in vitro, oryzalin, trifluralin

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Klasifikace a popis rodu <i>Phlox</i> L.</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Popis druhu <i>Phlox paniculata</i> L. a její využití.....	10
3.1.2 Šlechtění <i>Phlox paniculata</i> L. a jeho historie.....	11
3.1.3 Popis zdrojového genetického materiálu pro provedení experiment.....	12
<b>3.2 Polyploidie</b> .....	<b>13</b>
3.2.1 Metody detekce polyploidů.....	13
<b>3.3 In vitro technologie</b> .....	<b>14</b>
3.3.1 Metody in vitro.....	14
3.3.2 Totipotence buňky a explantátové kultury.....	14
3.3.3 Podmínky kultivace.....	15
<b>3.4 Regulátory růstu v podmínkách in vitro</b> .....	<b>16</b>
3.4.1 Auxiny.....	16
3.4.2 Cytokininy.....	17
3.4.3 Využití růstových regulátorů při kultivaci explantátů <i>Phlox paniculata</i> L.....	19
<b>3.5 Chemomutageny</b> .....	<b>19</b>
3.5.1 Kolchicin.....	19
3.5.2 Oryzalin.....	20
3.5.3 Trifluralin.....	21
<b>3.6 Poznatky o indukci polyploidie u <i>P. paniculata</i> L. v in vitro</b> .....	<b>21</b>
<b>4 Metodika</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Příprava materiálu, nástrojů a pracovního prostředí</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2 Sběr a příprava genetického materiálu</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Explantace a založení kultury</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 Experiment 1</b> .....	<b>25</b>
<b>4.5 Experiment 2</b> .....	<b>25</b>
<b>4.6 Indukce somatické embryogeneze</b> .....	<b>25</b>
<b>4.7 Neúspěšná část práce – vyhodnocení za pomoci průtokové cytometrie</b> ....	<b>26</b>
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 Dezinfekce výchozího rostlinného materiálu</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2 Zavedení kultury a regenerace získaných segmentů</b> .....	<b>27</b>
<b>5.3 Indukce somatické embryogeneze</b> .....	<b>28</b>
<b>5.4 Detekce polyploidů a chimér</b> .....	<b>29</b>
5.4.1 Detekce polyploidů.....	29

5.4.2	Detekce chimér.....	29
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>30</b>
6.1	Sterilizace.....	30
6.2	Použití regulátorů růstu.....	30
6.3	Embryogeneze.....	31
6.4	Detekce polyploidie a dalších mutací.....	31
6.5	Teplotní podmínky kultivace.....	31
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>37</b>
<b>10</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>38</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>38</b>

# 1 Úvod

Celý rod plamenky zahrnuje hned několik sadovnický významných okrasných druhů rostlin. Rozšířená trvalka plamenka latnatá (*Phlox paniculata* L.) byla introdukována do Evropy v osmnáctém století a stala se oblíbenou perenou. Její šlechtění však ve druhé polovině dvacátého století prakticky ustalo, zatímco v posledních dvou dekadách se opět vrací do bodu zájmu sadovníků i šlechtitelů, na čemž má velkou zásluhu rozšíření a zdokonalení metod *in vitro* kultivace.

Intenzivní explantátové množení představuje výrazně ekonomičtější proces než standardní postupy množení a nachází proto své využití v zemědělství při pěstování hospodářských rostlin a samozřejmě při množení okrasných rostlin. Důležité uplatnění nachází tato metoda také při snaze uchovat významný genetický materiál pro budoucnost v genových bankách.

Právě práce jako je tato, Jaineho et. al. (2002), Matisky a Vejsadové (2007) či Matisky (2009) se pak významně podílejí na rozvoji druhů a sortimentu této rostliny.

Dlouholeté šlechtění plamenky přineslo také velké množství zajímavých fenotypů, které však přirozeným množením ztrácejí záměrně vyšlechtěné vlastnosti. Tyto vyšlechtěné kvality dokážeme udržet za pomoci technologií *in vitro*, které zajišťují u plamenky vysokou stabilitu výchozího genetického materiálu.

Využitím *in vitro* technologií získáváme také vysoce variabilní výchozí šlechtitelský materiál nebo jedinečné chimerické jedince, jak ve své disertační práci uvádí Matiska (2009). Právě na jeho výzkum tato práce volně navazuje a klade si za cíl ověřit závěry Matiskových pokusů na plamence latnaté s indukci polyploidů vyvolaných antimitotickým agensem oryzalin - 3,5-dinitroN4, N4-dipropylsulfanilamid a vyzkoušet pro tyto účely agens s podobným schematem účinku trifluralin-2,6-Dinitro-N,N-dipropyl-4-trifluoromethylanilin.

Jen pouhé srovnání počtu možných genotypů a fenotypů u diploidního a tetraploidního jedince od Chloupka (2008) signalizuje, jak velký význam má polyploidie pro získávání variabilního výchozího šlechtitelského materiálu jak ke šlechtění pro kvalitativní znaky, pro které je pěstována jako okrasná rostlina, tak jako výchozí materiál pro šlechtění na specifické rezistence vůči jednotlivým patogenům *P. paniculata* L.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je v podmínkách *in vitro* ověřit možnost indukce polyploidních rostlin z listových segmentů plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) získaných přímo z rostlin pěstovaných ve skleníku (v podmínkách *in vivo*). Pro indukci polyploidie bude použita metoda infiltrace chemomutagenu (oryzalin a trifluralin) z pěstebního média. Dále ověřit předchozí pokusy s regenerací plamenky latnaté, využitím regulátorů růstu a indukce somatické embryogeneze.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Klasifikace a popis rodu *Phlox* L.

Rod *Phlox* (plamenka) se klasifikačně řadí dle Nováka a Skalického (2012) do třídy *Magnoliopsida* (dvouděložné), řádu *Polemoniales* (jirnicotvaré) a čeledi *Polemoniaceae* (jirnicovité).

Plamenky zahrnují přes osmdesát jednoletých i vytrvalých druhů původně ze Severní Ameriky a Sibiře. Rod plamenky zahrnuje mnoho sadovnický významných druhů, pěstovaných pro výrazné kvetení. Nižší druhy, rostoucí kobercovitě, kvetou během jara a na začátku léta. Vyšší, keřovité druhy plameňek jsou pak sadovnický významné zejména kvetením až do období vrcholného léta. Letničkové druhy plamenky kvetou od konce jara do podzimu.

Květ je trubkovitý s pěti okvětními plátkami, vyskytující se napříč rodem jednotlivě i v květenství vrcholíků a lat, listy vstřícné, ve vrchní části mohou být i střídavé, vejčité až kopinaté či jehlicovité. Plodem je tobolka (Brickell 2008).

Mezi významné vytrvalé zástupce rodu *Phlox* patří z keřovitě rostoucích: *P. paniculata* L., *P. maculata* L., *P. glaberrima* L., *P. × carnea* 'Sims', *P. carolina* L., *P. pilosa* L., *P. floridana* 'Benth', *P. amoena* 'Sims', *P. ovata* L., *P. divaricata* L., *P. stolonifera* 'Sims' a z nízkých do 30 cm): *P. subulata* L., *P. nivalis* 'Lodd', *P. bifida* 'Bock', *P. stellaria* 'Gray', *P. brittonii* 'Small', *P. bryoides* 'Nutt', *P. hoodii* 'Rich' (Matiska 2009).

#### 3.1.1 Popis druhu *Phlox paniculata* L. a její využití

Plamenka latnatá pochází ze Severní Ameriky z vlhkých řídkých lesů a okolí řek. Tvoří trsy vzpřímených lodyh, dorůstajících dle odrůdy 60-180 cm, bohatě kvetoucích květenstvím ve formě lat v některých případech až do poloviny října.

Jednotlivé květy jsou velké 1-5 cm, typické pro rod plamenky, trubkovité s pěti okvětními plátkami v barevném spektru od bílé, přes růžovou a fialovou až po červenou a oranžovou. Není příliš náročná na stanoviště a prosperuje v širokém spektru půd na plně osvětlených stanovištích i v polostínu. Nesnáší příliš dobře stres z letních úpalů a přísuší (Brickell 2008, Rice 2006).

Z hlediska sadovnictví je její význam právě ve výše zmiňované době kvetení, vysoké stanovištní adaptabilitě, ale i trvání doby kvetení, které může být až pět týdnů, a vysoké genetické variabilitě (Brickell 2008). V dnešní době je na trhu nepřehledné množství různých kultivarů plamenky latnaté a jejich hybridů. Na trhu se běžně vyskytují i chimerické vícebarevné a panašované odrůdy.

Několik příkladů v současné době oblíbených kultivarů plamenky latnaté pěstovaných v ČR: *Phlox paniculata* L. 'Fuji', *P. paniculata* L. 'Ida', *P. paniculata* L. 'Border Gem' či *P. paniculata* L. 'Europe'.

Pro svoji genetickou variabilitu a častou chimérickost je pro udržení fenotypu nutné vegetativní množení, kdy vysoký potenciál pro tyto potřeby vykazuje využití technologií

in vitro (Matiska 2009). Základní chromozomové číslo *Phlox paniculata* L. je 7, tedy 14 ve standardní diploidní sestavě 2n (Meyer 1944, Smith a Levin 1967). Mnoho odrůd má ale kromě čtrnácti základních ještě chromozomové fragmenty, ovlivňující genetickou variabilitu (Meyer 1944).

### 3.1.2 Šlechtění *Phlox paniculata* L. a jeho historie

*Phlox paniculata* L. byla do evropy introdukována roku 1732. Počátek šlechtění plamenky sahá do první poloviny devatenáctého století ve Francii a jeho výstup posloužil jako výchozí materiál šlechtitelům z Francie, Anglie a následně Německa, Belgie a Holandska. Nejvíce odrůd bylo získáno v první polovině dvacátého století (Böhm 1991). Mezi významné šlechtitele patřil například P. L. V. Lemoine, P. G. Gaganov nebo B. Ruys. Většina v současných odrůd jsou hybridy s *P. maculata* L., nebo *P. carolina* L. (Wherry 1955).

V popředí šlechtitelského zájmu u plamenky latnaté není pouze široké spektrum barevných variací květů, doby a délky kvetení a vzrůstu, ale i rezistence vůči rozšířeným patogenům plamenky, jako je *Erysiphe magnicellulata*, *Septoria phlogis*, nebo *Verticillium albo-atrum* (Šafránková 2006).

Využití metod in vitro explantátových kultur a indukce polyploidů u vybraných hybridů plamenky latnaté je vhodné pro získávání různorodého výchozího šlechtitelského materiálu s vysokým genetickým potenciálem (Matiska 2009).



Obr.č.1: *Phlox paniculata* L. 'fuji'



Obr. č. 2: *Phlox paniculata* L. 'laura'

### 3.1.3 Popis zdrojového genetického materiálu pro provedený experiment

Výchozím genetickým materiálem pro experimentální část práce jsou hybridy *Phlox paniculata* L. s pracovními názvy P-6 a P-14. Oba jsou vytvořené Ing. Pavlem Matiskou, Ph.D. Matkou u hybridu P-6 byla rostlina *Phlox paniculata* L. 'Laura' a hybridu P-14 *Phlox paniculata* L. 'Fuji'. Obě mateřské rostliny byly přirozeně opyleny metodou volného opylení ve skupině (Matiska 2009).



Obr. č.3: *Phlox paniculata* L. 'P-6'



Obr. č.4: *Phlox paniculata* L. 'P-14'

## 3.2 Polyploidie

Při polyploidním šlechtění se umělé vyvolají genomové mutace, při kterých vzniká upravený genotyp.

Polyploidizace je druhem mutace, při kterém dochází ke znásobení sad chromozomů na dvojnásobek z  $Xn$  na  $2Xn$ , kdy  $n$  vyjadřuje jeden chromozom a  $X$  vyjadřuje počet sad polyploidizovaného jedince. Vyskytuje se jak spontánně (například sedmdesát procent travin jsou spontánní polyploidi) (Opitz von Boberfeld 1994), tak indukovaná vnějšími vlivy jako je například inhibice tvorby telomer chemomutagenem kolchicin.

Je výhodná u druhů s nižším počtem chromozomů a zvyšuje genetickou variabilitu. Například u diploidů vznikají u jednotlivých genů tři genotypy, u tetraploidů pět a při neúplné dominanci se u tetraploidů projeví i pět fenotypů. U tetraploidních jedinců je častá snížená tvorba pylu a semen, proto při překročení určité hranice diploidů v populaci závislé na druhu způsobí postupnou eliminaci tetraploidů (Chloupek 2008).

### 3.2.1 Metody detekce polyploidů

#### a) Nepřímé metody

Selekce jedinců s typickými morfologickými změnami pro polyploidy, jako jsou deformace listů (kadeřeni), zvětšení květu či jiných orgánů. Typické je i snížení nasazení semen nebo plodů

(Graman a Čurn 1997), či zbarvení a tloušťka listů (Kermani et al 2003). Tyto morfologické změny a celkový projev polyploidie je však jedinečný pro každý druh, a proto nejsou obecně směrodatné (Stanys et al 2006). Z těchto metod se nejčastěji využívají metody měření velikostí a hustoty průduchů (Stanys et al 2006) nebo pylových zrn (Blakeslee a Avery 1937).

#### a) Přímé metody

Flow Cytometry Method (FCM), neboli průtoková cytometrie, je efektivní a rychlou metodou pro kvantitativní měření buněk nebo jejich částí, jako jsou buněčná jádra, a pro analýzu intenzity fluorescence jader obarvených DNA fluorochromem. Dokáže měřit také mixoploidy (Doležel 1997).

### 3.3 In vitro technologie

Rostliny se vyznačují vynikajícími schopnostmi regenerace buněk s neporušeným jádrem, které se říká totipotence. Po technické stránce není reprodukce rostlin technikou in vitro nijak složitá.

Pro zvýšení úspěšnosti procesu se dodávají v různých poměrech fytohormony auxiny a cytokiny, které ovlivňují vývoj, růst a určení rostlinných buněk a později přetvoření a přestavbu celé rostliny pouze z tzv. kalusu.

#### 3.3.1 Metody in vitro

Metody in vitro se používají pro mikropropagaci v případech potřeby ozdravit genetický materiál od patogenů (hlavně virů), není-li možné normální vegetativní množení, pro překonání nekřížitelnosti rostlinných jedinců buňčnou fúzí, či druhů, získání homozygotů, či zvýšení genetické variability výchozího šlechtitelského materiálu, indukci mutageneze atd.

Využívá kalusových a meristémových kultur, nebo pohlavní buňky či protoplasty pro získání haploidních jedinců (Krutina 1988).

#### 3.3.2 Totipotence buňky a explantátové kultury

Explantace je dle Hradilíka (2005) zavedení mechanicky oddělených částí rostlin do aseptické kultury v podmínkách in vitro.

Rostlinné explantátové kultury jsou založeny na totipotenci somatických buněk, což je schopnost jediné rostlinné buňky regenerovat v celé jedince (Novák 1990).

Zásadní pro práci s kulturami in vitro je aseptičnost. Tu je potřeba zajistit vhodným vybavením, jako je autokláv pro sterilizaci médií a náradí, flowbox a ideálně i UV-C lampy (Jha a Gosh 2005).

Pro sterilizaci výchozího materiálu pro experimentální část práce byl využit 10-20% roztok chlornanu sodného (NaClO) formou máčení odebraných celých listů z podmínek in vivo pod dobu 5-10min dle stáří sterilizovaného materiálu dle Matisky et al. (2007).

### 3.3.3 Podmínky kultivace

Primárním a asi nejdůležitějším nositelem podmínek v kulturách in vitro je kultivační médium. V současné době nejrozšířenějším používaným je médium Murashige a Skoog (MS), nebo od něj odvozené variace.

Složení základního MS média viz obrázek č.5 (Murashige a Skoog 1962, Kováč 1995).

Components	Standard mg/L	Actual weight (gm)	Final volume of stock (mL)	Volume of the stock per litre of medium (mL)
<b>Macroelements</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	33	1000	50
KNO <sub>3</sub>	1900	38		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	330	6.6		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	7.4		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	3.4		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>	27.90	1.395	500	10
Na <sub>2</sub> EDTA <sup>b</sup>	37.30	1.865		
<b>Microelements</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	0.31	500	10
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.30	1.115		
KI	0.83	0.0415		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60	0.43		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.0125		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.00125		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.00125		
<b>Organic components</b>				
Nicotinic acid	0.5	0.025	500	10
Pyridoxine-HCl	0.5	0.025		
Thiamine-HCl	0.1	0.005		
Glycine	2.0	0.1		
Myo-Inositol	100	5.0		
Sucrose	20,000–30,000	20–30	Added directly	
Agar <sup>c</sup>	7000–8000	7–8	Added directly	
pH	5.8–5.9			

Obr. č. 5.: Složení základního MS média

Murashige a Skoog (MS) je široce využívané médium v laboratořích pro kultivaci explantátových kultur v podmínkách *in vitro*. Bylo vyvinuto T. Murashigem a F. Skoogem v roce 1962 původně pro experimenty s tabákem. Obsahuje všechny potřebné mikroprvky, makroprvky, vitamíny a sacharózu pro regeneraci rostlinných explantátů. (Murashige & Skoog 1962).

Mezi významné faktory ovlivňující explantátové kultury je dále PH média, teplota, vzdušná vlhkost a osvětlení během kultivace (Neumann et al. 2009, Smith 2012).

Podle Neumanna et al. (2009) je pro většinu explantátových kultur nejvhodnější teplota mezi 20 a 30 °C. Nicméně je žádoucí stanovit ji samostatně pro každý konkrétní druh, protože jejich požadavky se liší.

### **3.4 Regulátory růstu v podmínkách *in vitro***

Auxiny a cytokininy jsou rostlinné hormony, které mají zásadní vliv na regeneraci, ontogenezi a morfogenezi rostlinných buněk a pletiv. V podmínkách *in vitro* se používá většinou jejich vhodná kombinace pro regulaci růstu, požadovanou morfogenezi a stimulaci dělení buněk. Mají vzájemný vztah a dělí se na přirozené a syntetické.

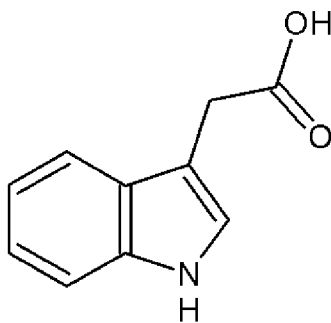
Tyto látky hrají také klíčovou roli v dediferenciaci a diferenciaci buněk potřebných pro regeneraci rostlinných explantátů. Převažující poměr cytokininu oproti auxinu podporuje regeneraci prýtlů, naopak převažující poměr auxinů stimuluje regeneraci kořenů. Vyvážená koncentrace stimuluje růst kalusu (Skoog a Miller 1957, Procházka a Šebánek et al. 1997).

#### **3.4.1 Auxiny**

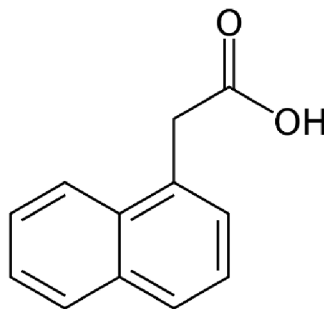
Auxiny jsou slabé kyseliny obsahující indolový nebo aromatický systém a vyznačují se špatnou rozpustností ve vodě (Bhojwani a Dantu 2013). Mají spíše stimulační efekt. Prvním objeveným a dlouho jediným známým přirozeným auxinem byla kyselina indolyl-3-octová (IAA). Dnes jsou známy i další, jako kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlor indolyl-3-octová (4-chlor IAA), kyselina fenylloctová (PAA). Ze syntetických auxinů významných pro kultury *in vitro* je potřeba zmínit kyselinu *α*-naphthylloctovou (NAA) a kyselinu dichlorfenylloctovou (2,4-D) (Procházka a Šebánek et al. 1997).

Pro tuto práci významná IAA je v explantátových kulturách hojně využívána, avšak její nevýhodou je velmi nízká stálost (Kováč 1995). K jejímu rozpouštění je vhodný zředěný ethanol nebo roztok NaOH (Bhojwani a Dantu 2013).

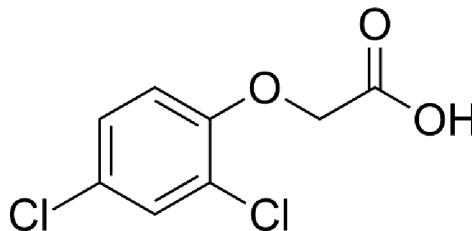




Obr.č. 6. Kyselina indolyl-3-octová (IAA)



Obr.č. 7. Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA)



Obr.č. 8. Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-

D)

### 3.4.2 Cytokininy

Cytokininy jsou fytohormony s mnohočetnými účinky na růst a dělení rostlin v závislosti na množství a kombinaci s auxinem.

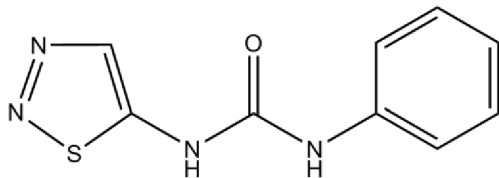
Cytokininy jsou v přirozené formě deriváty adeninu substituované na poloze N-6 a u jejich syntetických analogů vykazují vysokou cytokininovou aktivitu i některé substituované deriváty močoviny. V podmínkách *in vitro* za přítomnosti auxinu stimulují buněčné dělení a tvorbu kalusu (Procházka a Šebánek et al 1997, Skoog a Armstrong 1970).

Prvním objeveným přirozeným cytokininem byl zeatin (Letham 1973). Mezi nejdůležitější

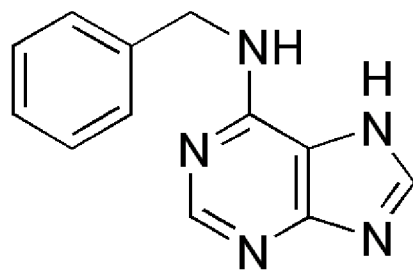
přirozené cytokininy pro in vitro kultury se řadí 6-benzyaminopurin (BAP), Kinetin (KIN), trans-zeatin (TZ) a meta-topoliny (MT) (Procházka et al. 1998). Ze syntetických cytokininů jsou pro in vitro kultury pravděpodobně nejaktivnější thidiazuron (TDZ), N,N'-difenyльмоčovina a N-fenyl-N'-pyridylmočovina (Mok 1982).

Vysoký potenciál TDZ, jakožto substituované sloučeniny fenylmočoviny, pro využití v in vitro kulturách uvádí i Murthy et al. (1998) pro její silnou cytokininovou i auxinovou aktivitu, navzdory skutečnosti, že není chemickým analogem auxinů, ani purinových cytokininů. Pro jejich rozpouštění jsou vhodné kyselé, alkalické vodní roztoky, nebo dimethylsulfoxid (DMSO).

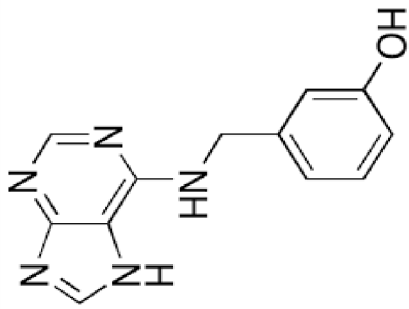
Při zavedení kultury do MS média s IAA a TDZ byly zaznačeny dvě skupiny kontrolních vzorků, kultivovaných po celou dobu experimentu pouze na tomto médiu bez přidání mutagenu.



Obr. č. 9: Thidiazuron - N-fenyl-N'-1,2,3-thiazol-5-yl močovina (TDZ)



Obr. č. 10: 6-benzyaminopurin (BAP)



Obr. č. 11: Meta topolin – m-hydroxybenzyladenin (MT)

### 3.4.3 Využití růstových regulátorů při kultivaci explantátů *Phlox paniculata* L.

Využití růstových regulátorů při kultivaci explantátů *Phlox paniculata* L. mg. L<sup>-1</sup> IAA v kombinaci s 0,5 mg. l<sup>-1</sup> BAP pro regeneraci kalusu a ve změněné koncentraci pro vyvolání somatické embryogeneze.

Fraga et al. (2004) dosáhl u plamenky organogeneze za použití BAP a kombinace BAP+NAA. Tyto závěry se při následných pokusech nepodařilo ověřit a jsou v rozporu, či v částečném rozporu, se závěry Matisky a Vejsadové (2007) a Matisky (2009), kterým se navzdory výše uvedeným nejlépe osvědčila u plamenky kombinace IAA a TDZ a jejich práce rozporuje účinnost kombinace IAA+ BAP u *P. paniculata* L. jako takové, neboť dochází mimo jiné k příliš časté vitifikaci.

Tyto závěry jsou v rozporu také s Decklerkem a Korbanem (1995), kteří považují TDZ pro použití u plamenky za nevhodné pro přílišnou stimulaci dlouhivého růstu. Jiné pokusy však vykazují u plamenky také účinnost kombinace 2,4D+BAP. (Šašek 2015).

Vzhledem k tomu, že tato práce volně navazuje na práci Matisky (2009) a v zadání má uloženo využít kombinaci IAA+TDZ, metodika této práce vychází z jeho závěrů a doporučení, jakožto školitele, využívající IAA+TDZ v koncentraci 1,5 mg.l<sup>-1</sup> TDZ a 0,5 mg.l<sup>-1</sup> IAA.

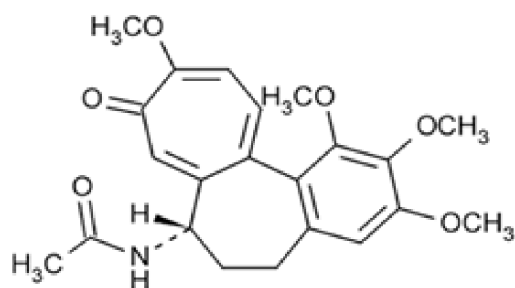
## 3.5 Chemomutageny

### 3.5.1 Kolchicin

Kolchicin je nesmírně jedovatý rostlinný alkaloid ocúnu jeseního (*Colchicum autumnale* L.) a nejdéle známý chemický mutagen využívaný pro indukci polyploidie. Získává se především extrakcí ze semen *C. autumnale* L.

Má své využití i v lékařství, je však vysoce toxický (Starý 1994). Je rozpustný v ethanolu a DMSO, ve vodě se rozpouští poměrně špatně (Hanzelka 2002). Působí jako mitotický inhibitor tvorby delicích vřetének v anafázi buňečného dělení (Pikálek 1997).

Pro tuto práci jsou však klíčové následující dva chemomutageny, proto kolchicinu nebude v této práci věnována další pozornost.

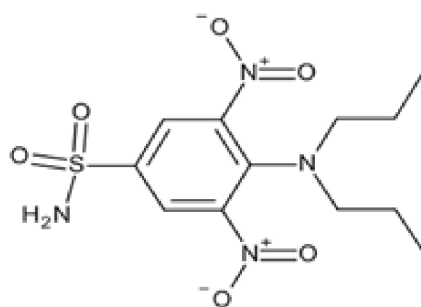


Obr.č. 12 Kolchicin  
 -N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamid

### 3.5.2 Oryzalin

Oryzalin- (3,5-dinitroN4, N4-dipropylsulfanilamid) ze skupiny dinitroalaninů, byl vyvinut jako syntetický herbicid u něhož byla následně zjištěna vysoká mutagenní aktivita jako inhibitoru tvorby telomer formou depolymerázy vznikajících vláken (Taiz a Zeiger 2010).

V posledních letech se oryzalin čím dál více prosazuje v podmínkách in vitro jako náhrada za kolchicin při indukci polyploidů v explantátových kulturách a ve většině prací je považován za jeho účinnější alternativu (Barandalla et al. 2006, Petersen et al. 2002). Toto potvrzuje i Matiska (2009) a uvádí i výskyt chimerických mixoploidů. Závěrům jeho pokusů s oryzalinem u *Phlox paniculata* L., je věnován prostor v následující kapitole rešerže.



Obr. č. 13: Oryzalin-3,5-dinitroN4, N4-dipropylsulfanilamid

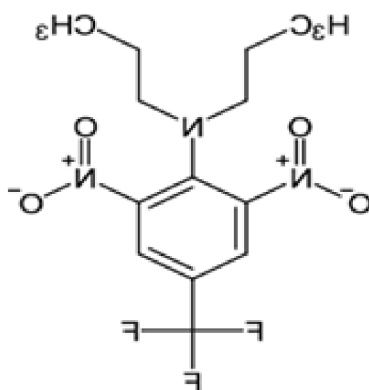
### 3.5.3 Trifluralin

Trifluralin-2,6-Dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl)aniline je dalším ze skupiny dinitroalaninových herbicidů, u kterého byla například Lignowskyn a Scottem (1972) a Youngovou a Camperem (1979) prokázána vysoká mutagenní aktivita jako inhibitoru tvorby dělicích vřetének na podobné bázi jako kolchicin, avšak v metafázi buněčného dělení.

V současné době je trifluralin v pokusech s indukcí polyploidů v podmínkách in vitro slibnou alternativou kolchicinu i oryzalinu.

Indukcí polyploidie u explantátových kultur in vitro vyvolanou Trifluralinem se zabývají například Cheng et al (2012) u *Allium cepa* L., Jiang et al. (2020), nebo Podwyszyńska (2012).

O jeho využití k polyploidizaci *Phlox paniculata* L. nejsou dostupné žádné informační zdroje, proto je tomuto tématu za účelem odvození základních informací pro metodiku experimentu této práce věnována část následujících kapitoly rešerže.



Obr. č. 14: Trifluralin-2,6-Dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl)aniline

### 3.6 Poznatky o indukci polyploidie u *P. paniculata* L. v in vitro

Jak již bylo naznačeno, primárním zdrojem pro tuto práci je disertační práce Ing. Pavla Matisky Ph.D. (2009), na kterou tato volně navazuje a který je také vedoucím této práce. Je také prakticky jediným dostupným uceleným zdrojem, ze kterého lze čerpat k tomuto tématu.

Matiska (2009) ve své práci dosáhl nejlepších výsledků u oryzalinu infiltrovaném z MS média s regulátory IAA+TDZ do regenerovaných listových explantátů při koncentraci/času v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  /den: 10/7, 40/7 a 10/14 u odrůdy 'Fujiama', nadále pak 20/7 a 10/14 u odrůdy 'Starfire'. Viz převzaté tabulky č. 1 a č. 2 (Matiska 2009).

Po konzulaci s vedoucím práce bylo rozhodnuto na základě níže uvedených výsledků

zaměřit se v experimentální části práce na koncentrace oryzalinu 10, 20 a 40  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a časové periody 7 a 14 dní pro infiltraci z média.

U trifluralinu je situace složitější, neboť nejsou dostupné žádné zdroje, ze kterých bychom mohli vycházet, tak jako třeba v případě oryzalinu. Proto je nutné vycházet ze závěrů prací zabývajících se účinky trifluralinu na explantáty v kultuře in vitro u jiných druhů a zkusit na jejich základě určit alespoň přibližný rozsah koncentrací pro infiltraci z MS média, se kterými lze pracovat u plamenky latnaté.

Autoři jako Cheng et al. (2012), pracující u trifluralinu s koncentracemi 100-200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  u *Allium sativum* L., nebo Quesenberry et al. (2010) s koncentracemi okolo 25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , a dále Dhooge et al. (2002), nebo Ebrahimzadeh et al. (2018), vedou autora i vedoucího práce k hypotéze, že panuje značná variabilita v efektivitě trifluralinu u jednotlivých druhů z hlediska potřebné koncentrace pro indukci polyploidů a k rozhodnutí se experimentální částí práce zaměřit primárně na koncentrace 20, 40, 80 a 160  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a časové periody 7 a 14 dní.

Varianta (oryzalin) $\mu\text{mol.l}^{-1}$ / den	Počet explantátů	Míra přežití (%)	Počet mixoploidů ( $2n + 4n; 2n + 3n$ ) (%)
-	38	97,37	0,00
10/7	10	90,00	0,00
20/7	30	86,67	10,00
40/7	30	83,33	0,00
10/14	50	62,00	8,00
20/14	60	50,00	0,00
40/14	40	45,00	0,00
10/21	40	42,00	0,00
20/21	60	55,00	0,00
40/21	30	46,67	0,00

Tabulka č. 1: Míra přežití při technice infiltrace oryzalinu z média u odrůdy ‘Starfire’  
Varianta (oryzalin) (Matiska 2009)

Varianta (oryzalin) $\mu\text{mol.l}^{-1}$ / den	Počet expl.	Míra přežití listů (%)	Počet získaných výhonů / živý expl.	Počet polyploidů (4n) (%)	Počet mixoploidů (2n + 4n) (%)	Efektivita polyploidizace (E)
-	10	100	4,2	0,00	0,00	0,00
10 / 7	78	7,69	3,50	0,00	2,56	0,00
20 / 7	78	7,69	2,33	0,00	0,00	0,00
40 / 7	78	3,85	8,00	1,28	0,00	0,05
10 / 14	78	3,85	6,00	1,28	0,00	0,05
20 / 14	78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40 / 14	78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabulka č. 2: Míra přežití a efektivita polyploidizace u listových segmentů při technice infiltrace oryzalinu z média u odrůdy 'Fujiyama' (Matiska 2009)

## 4 Metodika

Pokus probíhal ve školní laboratoři ČZU FAPPZ katedry Zahradnictví.

### 4.1 Příprava materiálu, nástrojů a pracovního prostředí

Výchozí rostlinný genetický materiál byl po zimování ve venkovních podmínkách přemístěn do skleníků školy pro minimalizaci tlaku patogenů z okolního prostředí. Z těchto byly napěstované prýty o velikosti cca 30 cm pro odběr listů a následnou explantaci segmentů.

Kultivace probíhala v místnosti k tomuto účelu dedikové, vybavené klimatizací a regály se zářivkovým osvětlením ve spektru blízkém dennímu světlu. Byla udržována konstantní teplota 21-22 °C, vzdušná vlhkost 60-65 % a světelná perioda 16 hodin denně (Neumann et al. 2009, Smith 2012).

MS médium bylo připraveno za pomoci zásobních roztoků, obsahujících rozpuštěné ingredience ve skupinách vyhovujících jejich skladování, nebo předem namíchané zakoupené směsi doplněné o agar, destilovanou vodu, regulátory růstu či mutageny.

Po rozmíchání komponent bylo médium rozpuštěno v mikrovlnné troubě. Následně bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C a při zvýšeném tlaku po dobu 7-15 min. Mutageny byly přidávány do média rozpuštěné v DMSO a skladované takto o teplotě 7 °C. PH média bylo regulováno na hodnoty 5,7-5,8 za pomoci roztoků kyseliny citrónové, chloridu draselného (KCl) a měřeno na digitálním PH metru.

Detailní složení MS média je patrné z tabulky č. 1. Takto připravené médium bylo následně rozlito do petriho misek, nebo 200 ml erlen nádob objemu cca 25 ml, ponecháno k zatuhnutí a zajištěno proti kontaminaci. Použití tohoto média vychází ze závěrů (Jain et al. 2002, Matiska 2009, Declerck and Korban 1995).

Nezbytným materiálem a nástroji pro provedení experimentu byly:

- Flowbox zajišťující sterilní pracovní prostředí. K jeho sterilizaci bylo využito zářivky UV- C po dobu 45 min a následné ošetření pracovní plochy technickým ethanolem.
- Použité nástroje byly zejména mikropipety, nádoby erlen 200-1000 ml, skleněné petriho misky o průměru 20 cm, plastové petriho misky o průměru 10 cm, skalpel, pinzety a další. Všechny nástroje byly sterilizovány v autoklávu a během práce také máčením v ethanolu a opalovány za pomoci lihového kahanu.
- Nezbytné vybavení laboratoře také zahrnuje výše zmíněný autokláv a PH metr, laboratorní váhy s vysokým rozlišením a přístroj na reverzní osmózu.

## 4.2 Sběr a příprava genetického materiálu

Materiál pro explantaci byl získán z rostlin *Phlox paniculata* L. pracovních názvů 'P-6' a 'P- 4' pěstovaných in vivo ve školním skleníku v průběhu měsíce března a dubna. Sběr byl realizován pouze z vrchních pěti až šesti pater prýtu a pouze u listů nevykazujících žádné morfologické změny nebo poškození patogeny.

Tyto listy byly po odebrání sterilizovány máčením v roztoku běžného čistícího prostředku SAVO obsahujícího roztok 4,7% NaClO při koncentraci 10-20 % v destilované vodě za přidání komerčního smáčedla pro využití v ochraně rostlin - cca 2 ml na litr roztoku v závislosti na stáří listů a s nimi související kontaminací. Toto máčení probíhalo po dobu 10 minut.

Takto sterilizovaný materiál byl následně proplachován ve sterilní destilované vodě minimálně třikrát po dobu 15 minut. Následně se přikročilo k explantaci.

## 4.3 Explantace a založení kultury

Explantace, v toto případě odběr listových segmentů, probíhala ve flowboxu za přísného dodržení sterilních podmínek.

Ze sterilizovaných listů byly explantovány čtvercové segmenty o ploše cca 1 cm<sup>2</sup>, s řeznou hranou na všech stranách a zbavené středového cévního svazku i čepele listu. Práce byla prováděna ve sterilizovaných skleněných petriho miskách za použití pinzety a skalpelu. Celkově bylo v průběhu experimentu založeno více jak 1500 jednotlivých listových segmentů ke kultivaci.



Takto získané segmenty byly zavedeny do připravených plastových petriho misek s MS médiem doplněným o 0,5 mg IAA a 1,5 mg TDZ na litr roztoku média a následně regenerovány po dobu 7 dní. S takto regenerovanými segmenty v zavedené kultuře jsem poté založil dva experimenty.

#### 4.4 Experiment 1

Při zavedení kultury do MS média s IAA a TDZ byly zaznačeny dvě skupiny kontrolních vzorků, kultivovaných po celou dobu experimentu pouze na tomto médiu bez přidání mutagenu.

Pro experiment bylo připraveno do petriho misek MS médium doplněné o růstové regulátory IAA a TDZ o koncentraci 0,5 mg a 1,5 mg na litr média a o mutagen oryzalin (3,5-dinitro-N<sub>4</sub>,N<sub>4</sub>-dipropylsulfanilamid) ve třech různých koncentracích – 10, 20 a 40  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Z regenerované kultury byl před převedením odstraněn veškerý kontaminovaný a uhynulý materiál.

Regenerovaná explantáty na MS médiu s IAA a TDZ byly po sedmi dnech regenerace ve flowboxu převedeny na připravené médium s antimitotikem v počtu minimálně 50 explantátů od obou zkoumaných odrůd pro každou koncentraci a dobu infiltrace (7 a 14 dní). Takto založený experiment byl následně kultivován po výše zmíněné doby a následně opět zbaven kontaminací, úhynu a převeden k opětovné regeneraci po minimálně tři týdny.

#### 4.5 Experiment 2

Experiment č. 2 má v podstatě shodnou metodiku a postup jako experiment č. 1.

Pro experiment bylo připraveno do petriho misek MS médium doplněné o růstové regulátory IAA a TDZ o koncentraci 0,5 mg a 1,5 mg na litr média a o antimitotikum trifluralin (2,6-Dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl)aniline) ve třech různých koncentracích – 20, 40, 80 a 160  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Opětovně bylo provedeno odstranění kontaminací a úhynu.

Převední explantátů na médium s mutagenem na požadovaný časový úsek a zpětné převední na médium bez mutagenu s IAA a TDZ k následné regeneraci na minimálně tři týdny. Metodika je v tomto bodu shodná s experimentem č. 1.

#### 4.6 Indukce somatické embryogeneze

U regenerovaných přeživších explantátů již po třech týdnech docházelo ke spontánní somatické embryogenezi a rašení prýtlů z regenerovaného kalusu, zřejmě z důvodu částečného

vyčerpání zásoby růstových regulátorů v médiu. Po konzultaci s vedoucím práce byla tato kultura postupně převáděna do erlen nádob o objemu 200 ml s čistým MS médiem (bez IAA a TDZ) pro zapěstování prýtů a přípravu na vyhodnocení experimentu.

#### **4.7 Neúspěšná část práce – vyhodnocení za pomoci průtokové cytometrie**

V metodice experimentu bylo plánováno po zapěstování prýtů z přeživších explantátů využít pro vyhodnocení metodu detekce průtokovou cytometrií a její výstup statisticky vyhodnotit a interpretovat prostřednictvím tabulek. V tomto bodě byl však experiment neúspěšný.

## 5 Výsledky

Vlivem náhlé nežádoucí změny teploty během kultivace došlo k úhynu všech explantátů a rostlin v kultivačních prostorách laboratoře. Experiment nebylo následně možné opakovat z důvodu omezujících opatření proti šíření viru Covid-19. Proto může tato práce vykázat pouze částečné výsledky a odpovědět jen na některé otázky vyplývající ze stanovených cílů.

### 5.1 Dezinfekce výchozího rostlinného materiálu

Využití čistícího prostředku SAVO v roztoku dle postupu popsáno v metodice se ukázalo jako dostatečné a efektivní, kdy po sedmi dnech regenerace následně zavedených kultur byla maximální kontaminace z regenerovaných segmentů 20 % u posledního provedeného odběru listů (tedy z nejstarších prýtů), při koncentraci roztoku 20 %.

### 5.2 Zavedení kultury a regenerace získaných segmentů

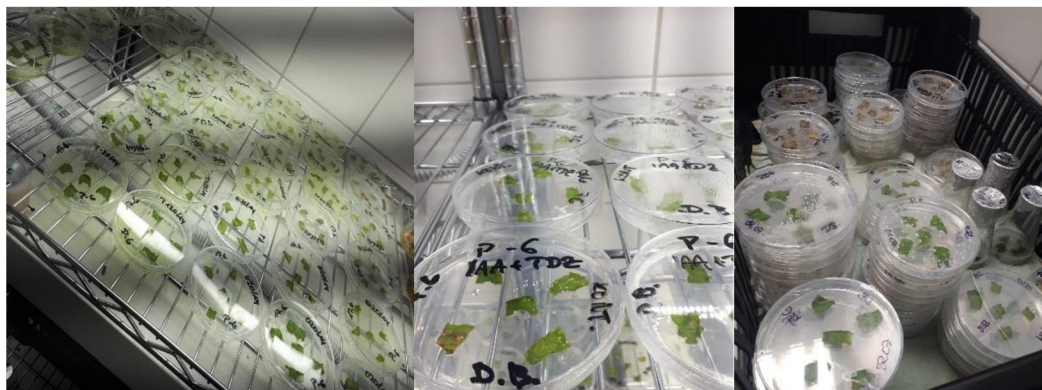
Po sedmi dnech regenerace zavedených segmentů již bylo zřejmé, že pokusný hybrid 'P-6' vykazuje výrazně horší adaptabilitu na introdukované podmínky *in vitro* než 'P-14'. Kdy u 'P-4' byl nekonzatminální úhyn po sedmi dnech 0 %, ale u 'P-6' to bylo 10-15%.

Obr.č. 15,16 a 17: Snížená adaptabilita a úhyn jednoho z pokusných hybridů 1,2,3.



Tento trend se v průběhu delší kultivace a vystavení mutagenům prohluboval po celou její dobu a vyústil v úhyn více než 90 % všech explantátů 'P-6' ještě před hromadným úhynem všech vzorků. Úhyn v tomto období u 'P-14' dosahoval hodnot 40-60 % v odpovídající korelaci s koncentrací použitého antimetabitu a doby expozice.

Obr. č. 18,19,20: Fotodokumentace založení pokusu 1,2 a 3.

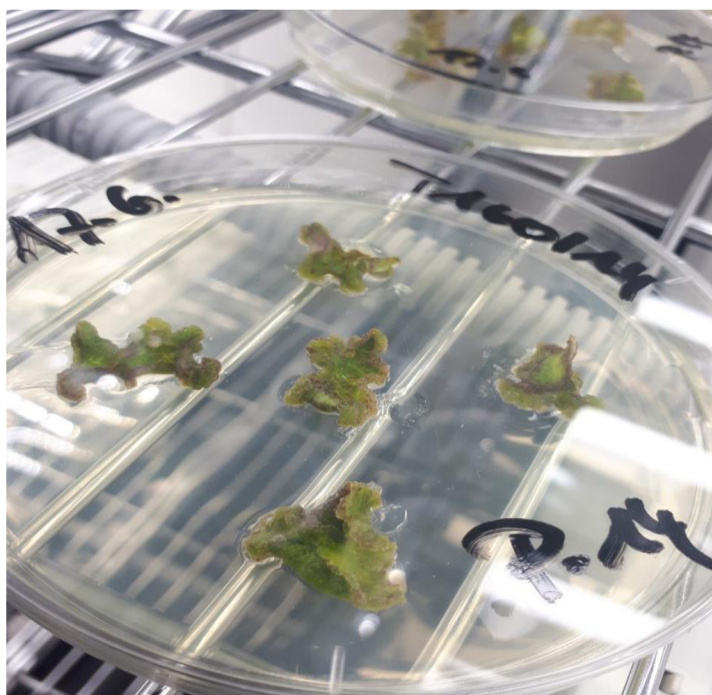


### 5.3 Indukce somatické embryogeneze

Po převedení segmentů z média s chemomutageny a následné regeneraci po dobu 21 dní byla již zřejmá tvorba embryonálního kalusu u obou sledovaných odrůd a u některých segmentů také počáteční tvorba prýtků. Tento stav byl pravděpodobně vyvolán částečným vyčerpáním růstových regulátorů, zejména IAA z kultivačního média.

Tyto segmenty byly postupně převáděny na čisté MS médium ve 200ml erlen nádobách, kde přibližně 50 % segmentů a regenerovaného kalusu uhynulo ihned po převedení na médium prosté růstových regulátorů a 50 % začalo tvořit běžné prýtky vhodné k dalšímu využití a vyhodnocení experimentu.

Obr. č. 21: Regenerovaný explantát a kalus s počáteční embryogenezí



## **5.4 Detekce polyploidů a chimér**

Vzhledem k nemožnosti experiment vyhodnotit využitím průtokové cytometrie, odkazuje práce v tomto ohledu pouze na dílčí výsledky získané pomocí nepřímých metod detekce polyploidů, tak jak jsou popsány Matiskou (2009) v jeho práci. Využití těchto metod probíhalo vždy za přítomnosti vedoucího práce a bylo společně konzultováno.

### **5.4.1 Detekce polyploidů**

U několika explantátů a následně vypěstovaných prýtů (v řádu jednotlivých kusů) byly pozorovány morfologické změny signalizující možnou polyploidii nebo jiné významné genetické změny. Tyto morfologické projevy byly zejména kadeřovitě deformované prýty, výrazně vyšší či nižší obsah chlorofylu v listech. U kalusu pak zejména výrazné změny v rychlosti dělení kalusových buněk, struktuře kalusu spojené často s výraznou změnou barvy.

Tyto změny byly pozorovány zejména u odrůdy 'P-14', ale také dvou vzorků 'P-6', u nichž však nebylo možné ani odhadovat, zdali se jedná o důsledek mutagenese vlivem užitých antimitotik, vlivem zvolených růstových regulátorů, nebo špatnou celkovou adaptabilitou odrůdy na podmínky *in vitro*.

Jako nejpotentnější se projeví koncentrace mutagenů 20/14, 40/7 u oryzalinu a 40/14 a 80/7 i 14 u trifluralinu. Jsou to však spíše autorovy domněnky a jediné co se dá prokázat je, že obě pokusné odrůdy byly po vystavení dávkám popsaným v metodice byly schopné regenerovat a dále se rozvíjet.

### **5.4.2 Detekce chimér**

Mezi kultivovanými segmenty byly pozorovány dvě skupiny následně vypěstovaných chimerických prýtů s panašovanými listy (tedy s chimérickou poruchou tvorby chlorofylu). Tyto chiméry se jevíly dostatečně životaschopně pro převedení do podmínek *in vivo*. Dále byla detekována jedna skupina albinických prýtů s žádným nebo zcela minimálním obsahem chlorofylu v listech. Ta se však brzy projevila neživotaschopná a samovolně uhynula během kultivace na čistém MS médiu.

Vzhledem k okolnostem zmíněným v počátku kapitoly nebylo možné pozorované potenciálně geneticky zajímavé jedince dále zkoumat a naplnit tak stanovené cíle práce a nezbyvá než s politováním konstatovat, že v tomto bodě byla práce neúspěšná.

Obr. č. 22,23 s 24: Fotodokumentace experimentu s mutageny 1,2 a 3.



## 6 Diskuse

### 6.1 Sterilizace

Při dezinfekci rostlinného materiálu bylo během experimentu dosaženo uspokojivých výsledků za použití NaClO v koncentraci odpovídající 1-2% roztoku, což se shoduje s postupem Matisky (2009), kdy v posledních fázích odběru a desinfekcí dvouprocentním roztokem již byla efektivita snížena na cca 80 %.

Šašek (2015) dokonce uvádí sterilizaci roztokem 1% na 10 minut jako nedostatečnou. Declerck a Korban (1995) uvádí jako dostatečnou koncentraci 0,43%. Lze tedy pochybovat, zda Declerck a Korban odebírali rostlinný materiál pro své pokusy skutečně v podmínkách in vivo, kde jsou rostliny vystaveny vždy alespoň minimálnímu tlaku patogenů.

### 6.2 Použití regulátorů růstu

Autoři Matiska (2009) a Declerck a Korban (1995) zmiňují ve svých pracích variabilní odezvu různých odrůd *Phlox paniculata* L. na převedení do in vitro kultury a různé růstové regulátory. Vzhledem k ve výsledcích popsané reakce hybridu 'P-6' v porovnání s 'P-14' za užití již vyzkoušeného média s regulátory IAA a TDZ, tak tato práce zmíněné závěry potvrzuje.

Již v rešerži bylo diskutováno využití různých regulátorů růstu a introdukovan rozpor ve zdrojových pracích autorů Matisky (2009), Jain et al. (2002), a Šaška (2015).

Jain et al. (2002) uvádí jako nejúčinnější kombinaci BAP 0,5 mg. l<sup>-1</sup> + IAA 2,0 mg. L<sup>-1</sup>,

Matiska (2009) a Šašek (2015) však dosáhli nejlepších výsledků s kombinací 2,4D + BAP nebo samotnou 2,4D. Výsledky Matisky (2009) vhodnost využití kombinace IAA+ BAP přímo rozporují. U kombinací s 2,4D lze však polemizovat o účinku BAP z důvodu velice silného účinku samotného 2,4D.

U listových segmentů je dle Matisky (2009) nejlepší kombinací IAA a TDZ v koncentraci IAA 0,5 mg. l<sup>-1</sup> + TDZ 1,5 mg. l<sup>-1</sup> což potvrzuje i tato práce vzhledem k velmi dobré regeneraci u odrůdy P-14' v průběhu experimentu.

### 6.3 Embryogeneze

Po uplynutí minimální stanovené doby regenerace (21 dní) a po převedení z médií obsahujících chemomutageny nebylo u přeživších explantátů nutné vyvolávat embryogenezi, jako to bylo potřeba například v pokusech Jain et al. (2002). Embryogeneze se při experimentu indukovala postupně u téměř všech samovolně, bez potřeby převedení na médium s jinou koncentrací či kombinací růstových regulátorů.

Toto si autor i vedoucí práce vysvětlují pravděpodobným částečným vyčerpáním IAA z kultivačního média pro jeho nestálost a následným dominantnějším účinkem TDZ, což nejen potvrzuje závěry Skooga a Millera (1957), ale i v předchozí podkapitole zmíněné závěry Matisky o vhodnosti kombinace IAA 0,5 mg. l<sup>-1</sup> + TDZ 1,5 mg. l<sup>-1</sup> u kultivace listových segmentů plamenky latnaté.

### 6.4 Detekce polyploidie a dalších mutací

O výsledcích týkajících se tohoto tématu lze oprávněně pochybovat a polemizovat s nimi, vzhledem k tomu, že bylo využito pouze nepřímých metod detekce. V in vitro kulturách není možnost efektivně využít metody měření průduchů (Stanys et al., 2006), ani metody měření pylových zrn, jak popisuje například Blakeslee a Avery (1937). Zbývají potom již pouze velice neprůkazné metody detekce založené na empirickém pozorování vzorků.

Tyto konkluze pak lze označit spíše za domněnky autora a zejména vedoucího práce, díky jeho letitým zkušenostem s pozorováním *P. paniculata* L. v průběhu experimentů.

U chimér, jak vyplývá z výchozích prací, lze také pouze spekulovat, bez možnosti jejich dalšího zkoumání, zda-li jejich indukci způsobila spíše interakce s chemomutageny, nebo spíše kultivací za působení použitých regulátorů růstu.

### 6.5 Teplotní podmínky kultivace

Lze také vyvodit závěr o důležitosti správných kultivačních podmínek během práce s in vitro

kulturami odkazem na Neumanna et al. (2009). V průběhu experimentu, kdy teplota v kultivačních protorách byla konstantně udržována 21-22 °C, což koreponduje právě s Neumannem, došlo poté selháním technologie k prudkému nárůstu teploty.

Teplota vzrostla na 40-45 °C na dobu 12-24h, což mělo za následek úhyn všech kultur v místnosti. Neumann však ve své práci doporučuje teploty 20-30 °C. Zmiňuje ale také, že každý rostlinný druh prosperuje v in vitro podmínkách v jiné ideální teplotě a některé tropické druhy mohou vyžadovat teplotu až 35 °C.



## 7 Závěr

- V průběhu práce byla ověřena efektivita a správnost závěrů Matisky a Vejsadové při introdukci listových segmentů *Phlox paniculata* L. do in vitro kultur za využití růstových regulátorů IAA a TDZ v koncentraci 0,5 mg IAA a 1,5 mg TDZ.
- Ověřen byl také Matiskův postup při desinfekci odebraných listů plamenky za pomoci čistícího prostředku SAVO jako levné, jednoduché a efektivní metody.
- Z regenerovaných explantátů byla po infiltraci chemomutageny úspěšně indikována somatická embryogeneze a získány životaschopné prýty pro opětovné převedení do podmínek in vivo.
- Za využití alespoň nepřímých metod detekce polyploidních jedinců byly částečně ověřeny Matiskovy závěry o efektivitě antimitotika oryzalin (Oryzalin-3,5-dinitroN<sub>4</sub>,N<sub>4</sub>-dipropylsulfanilamid) pro indukci polyploidie u plamenky latnaté.
- Práce zmapovala alespoň část dostupných zdrojů o využití trifluralinu, potenciálně přínosných pro experimenty s plamenkou latnatou. Vytvořila prvotní metodiku stanovující rozsah testovaných koncentrací a alespoň částečně úspěšně ověřila její správnost.
- Pozorováním chimerických a albinických prýtů práce ověřila Matiskovy závěry o poměrně častém výskytu těchto mutací a v neposlední řadě také význam technologií in vitro pro získávání výchozího šlechtitelského materiálu u *P. paniculata* L.
- I když práce nebyla v hlavním stanoveném cíli, tedy vyhodnocení obou experimentů průtokovou cytometrií, úspěšná, z dílčích výsledků můžeme odvodit význam využití metod in vitro pro získávání nového potentního výchozího šlechtitelského materiálu u *Phlox paniculata* L. Takto získaný materiál je cenným zdrojem pro šlechtitele a velkou měrou přispívá k rozšiřování a zvyšování kvalit stávajícího sortimentu u této sadovnické významné trvalky.

## 8 Literatura

1. Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. 2013. Plant Tissue Culture. Springer. London. <http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>.
2. Blakeslee A. F., Avery, A. G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine. *Journal of heredity*, 28(12): 393 – 411.
3. Böhm, Č. 1991. Trvalky: ozdoba zahrady i bytu. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha. 112 s. ISBN: 8085362066.
4. Brickell, CH. 2008. A-Z encyklopedie zahradních rostlin. Knižní klub. Praha. 1128 s. ISBN 9788024220697 .
5. Declerk, V., Korban, S. S. 1995. Shoot regeneration from leaf tissue of *Phlox paniculata* L. *Plant Physiology*. 147.:441 – 446.
6. Dhooghe, E., Grunewald, W., Leus, L. *et al.* 2002. In vitro polyploidisation of *Helleborus* species. *Euphytica* **165**:89–95 <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9763-9>..
7. Doležel J., Lucretti S., Macas J. (1997) Analysis and sorting of chromosomes in plants using flow cytometry *Biologické Listy* 62: 131-160.
8. Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Shariatpanahi, M.E. *et al.* 2008. Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **135**: 407–417 <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1473-y>.
9. Graman, J., Čurn, V. 1997. Šlechtění rostlin (obecná část). Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 133 s.
10. Hanzelka P. 2002. Tvorba genových zdrojů u *Callistephus chinensis*. Cestou indukované polyploidizace, disertační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Lednice. 157 s.
11. Hradilík, J. 2005. Rostlinné explantáty. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 85 s. ISBN 80-7157-915-7.
12. Fraga, M, Alonso, M., Borja, M. 2004. Shoot Regeneration Rates of Perennial Phlox are Dependent on Cultivar and Explant Type. *Hortscience*. 39 (6): 1373 – 1377.

13. Cheng Z.-H. , Zhou X.-J. , Khan X.-J., Su L. and Meng H-W. 2012. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, China 2 PMAS-Arid Agriculture University, Rawalpindi, Pakistan, Genet. Mol. Res. 11 (3): 2620-2628 DOI:10.4238/2012.
14. Chloupek, O. 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha. 312 s. ISBN: 9788020015662.
15. Jain, A., Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. Scientia Horticulturae. 94: 137 – 143
16. Jiang, Y., Liu, S., Hu, J. *et al.* 2020. Polyploidization of *Plumbago auriculata* Lam. in vitro and its characterization including cold tolerance. Plant Cell Tiss Organ Cult **140**: 315–325. DOI:10.1007/s11240-019-01729-w.
17. Kermani, M. J., Sarasan, V., Roberts, A. V., Yokoya, K., Wentworth, J., Sieber, V. K. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical and applied genetics, 107 (7), p. 1195 – 1200.
18. Kováč, Jaroslav. 1995. Explantátové kultury rostlin. 1. přepracované vydání, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Olomouc..
19. Krutina, J. 1988. Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví. 2. vydání. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 416 s. ISBN: 0702888 .
20. David Stuart Letham. 1973. Cytokinins from *Zea mays*. Phytochemistry. Volume 1. Issue 10:2445-2455. ISSN 0031-9422.
21. Lignowski, E., & Scott, E. 1972. Effect of Trifluralin on Mitosis. Weed Science, 20(3): 267-270. doi:10.1017/S0043174500035578.
22. 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..
23. Matiska, P., Vejsadová, H. 2007. Induction of morphogenesis in *Phlox paniculata* L. In. The tree and flower a part of life. VÚKOZ. Průhonice: 225 – 227.
24. Meyer, J. R. 1944. Chromosome studies of *Phlox*. Genetics, 29: 199 – 216.
25. Mok M.C. , Mok D.W.S., Armstrong D.J., Shudo K., Isogai, Okamoto T. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron), Phytochemistry. Volume 21. Issue 7: 1509-1511.

26. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473 – 497.
27. Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 34: 267 – 275
28. Neumann, K. H., Kumar, A., Imani, J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. Springer - Verlag. Berlin:325. ISBN: 9783540938828.
29. Novák, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia Praha. 208 s. ISBN: 8020003444.
30. Novak, Jan & Skalicky, Milan. (2012). *Botanika: Cytologie, histologie, organologie a systematika - 3. ed.* Powerprint. ISBN: 978 80 87415 53 5.
31. Opitz von Boberfeld, W. 1994. *Grünlandlehre*. Eugen Ulmer, Stuttgart, 336 s.
32. Podwyszyńska, M. 2012. In vitro tetraploid induction in Tulip (*Tulipa Gesneriana* L.). *Acta Horti* 961:391-396 DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.51.
33. Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha. 460 s. ISBN: 8020005862.
34. Procházka, S., Šebánek, J. a kol. 1997. *Regulátory rostlinného růstu*. Academia. Praha. 380 s. ISBN: 8020005978.
35. Quesenberry, K.H., Dampier, J.M., Lee, Y.Y. et al. 2010. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica* 175:43–50. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0165-4>
36. Petersen, K. K., Hagberg, P., Kristiansen, K. 2002. In vitro chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant Breeding*, 121: 445 – 450.
37. Pikálek, P. 1997. *Zahradnický slovník naučný 3. CH-M (kolchicin)*. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, s. 185.
38. Rakouský, S. 2001. *Rostlinné explantáty*. 1. vydání. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 99 s.
39. Rice, G. (ed.). 2006. *Royal Horticultural Society Encyclopedia of Perennials*. Dorling Kindresley. London. p. 496. ISBN: 1405306009..
40. Skoog F., and, and Armstrong D. J. 1970. Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* 21:1: 359-384.
41. 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):118 – 130.

42. Smith, R. H. 2012. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. 3rd ed. Academia Press. San Diego. 208 p. ISBN: 9780124159204.
43. Smith, D. M., Levin, D. A. 1967 Karyotypes of eastern North American Phlox. American journal of botany, 54 (3): 324– 334.
44. Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., Duchovskis, P. 2006. In vitro induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 84 (3): 263 – 268.
45. Starý, F. 1994. Zahradnický slovník naučný 1. A-C (colchicum). Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha: 373 – 374.
46. Šafránková, I. 2006. Patogeny plamenky. Zahradnictví. 3 : 36 – 37.
47. Šašek, O. 2015. Indukce somatické embryogeneze u plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) v podmínkách in vitro. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů. Praha. 56 s
48. Taiz L, Zeiger E (2010). Plant Physiology (5th ed.). Sinauer Associates: 433–434. ISBN 978-0-87893-866-7.
49. Wherry, E. T. 1955. The genus Phlox. Morris Arboretum Monographs III. Morris Arboretum of the University of Pennsylvania, Philadelphia, 174 s.
50. Young Linda W., Camper N.D. 1979. Trifluralin effects on tobacco callus tissue: Mitosis and selected metabolic effects, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 12, Issue 2: 117-123. ISSN 0048-3575, DOI:10.1016/0048-3575(79)90075-0.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

2,4-D - kyselina dichlorfenoxyoctová

4-chlor IAA - kyselina 4-chlor indolyl-3-octová

BAP - 6-benzyaminopurin

DMSO - dimetylsulfoxid

DNA - **Deoxyribonukleová kyselina**

FCM - Flow Cytometry Method

IAA - kyselina indolyl-3-octová  
IBA - kyselina indolyl-3-máselná  
Kcl - chlorid draselný  
KIN - Kinetin  
L. - Carl Linné  
MS - Murashige a Skoog  
MT - meta-topoliny  
NAA - kyselina  $\alpha$ -naphthylacetic  
NaOH - hydroxid sodný  
PAA - kyselina fenylacetic  
PH - angl. potential of hydrogen, též vodíkový exponent  
TDZ - thidiazuron  
TZ - trans-zeatin  
UV-C - ultrafialové záření typu C

## 10 Seznam tabulek

1. Tabulka č.1: Tabulka č. 1: Míra přežití při technice infiltrace oryzalinu z média u odrůdy 'Starfire' Varianta (oryzalin) – Převzato (Matiska 2009)
2. Tabulka č.2: Míra přežití a efektivita polyploidizace u listových segmentů při technice infiltrace oryzalinu z média u odrůdy 'Fujiyama' – Převzato (Matiska 2009)

## 11 Seznam obrázků

1. Obr.č.1: *Phlox paniculata* L. 'fuji'
2. Obr.č.2: *Phlox paniculata* L. 'Laura'
3. Obr. č.3: *Phlox paniculata* L. 'P-6'
4. Obr. č.4: *Phlox paniculata* L. 'P-14'
5. Obr.č.5: Složení základního MS média

6. Obr. č. 6: Kyselina indolyl-3-octová (IAA)
7. Obr. č. 7: Kyselina  $\alpha$ -naftyl-octová (NAA)
8. Obr. č. 8: Kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D)
9. Obr. č. 9: Thidiazuron - N-fenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl močovina (TDZ)
10. Obr. č. 10: 6-benzyaminopurin (BAP)
11. Obr. č. 11: Meta topolin – m-hydroxybenzyadenin (MT)
12. Obr. č. 12 Kolchicin  
-N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamid
13. Obr. č. 13: Oryzalin-3,5-dinitro-N,N-dipropylsulfanilamid
14. Obr. č. 14: Trifluralin-2,6-Dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl)aniline
15. Obr. č. 15: Snížená adaptabilita a úhyn jednoho z pokusných hybridů 1.
16. Obr. č. 16: Snížená adaptabilita a úhyn jednoho z pokusných hybridů 2.
17. Obr. č. 17: Snížená adaptabilita a úhyn jednoho z pokusných hybridů 3.
18. Obr. č. 18: Fotodokumentace založení pokusu 1.
19. Obr. č. 19: Fotodokumentace založení pokusu 2.
20. Obr. č. 20: Fotodokumentace založení pokusu 3.
21. Obr. č. 21: Regenerovaný explantát a kalus s počáteční embryogenezí.
22. Obr. č. 22: Fotodokumentace experimentu s mutageny 1.
23. Obr. č. 23: Fotodokumentace experimentu s mutageny 2.
24. Obr. č. 24: Fotodokumentace experimentu s mutageny 3.







