

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta lesnická a dřevařská**



**Bakalářská práce**

**2017**

**Lucie Hartingerová**

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa



**Mikropropagace pěnišníku daurského  
(*Rhododendron dauricum* L.) pomocí in vitro metod**

Bakalářská práce

Autor: Lucie Hartingerová

Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Lucie Hartingerová

Lesnictví

Název práce

**Mikropropagace pěnišníku daurského (*Rhododendron dauricum* L.) pomocí in vitro metod.**

Název anglicky

**In vitro micropropagation of *Rhododendron dauricum* L.**

---

### Cíle práce

Vypracování literární rešerše množení pěnišníku daurského pomocí in vitro metod. Vyhodnotit vliv auxinů a cytokininů na růst explantátů pěnišníku daurského. Zaměřit se na růst kultur ve fázi multiplikace, zakořeňování a přesazení do nesterilních podmínek.

### Metodika

Získání literárních zdrojů pro vypracování literární rešerše k in vitro pěstování rostlin, zvláště se zaměřením na množení pěnišníků a azalek.

Pěstování kultury pěnišníku daurského v prostředí in vitro a následné využití sterilní kultury pro vyhodnocení vlivu přídatku auxinů a cytokininů v médiích pro multiplikaci a zakořeňování kultur.

Při sledování vlivu auxinů a cytokininů na in vitro kultury pěnišníku, by měl být zvláště hodnocen vliv těchto látek na růst prýtů a kořenů a na přežívání rostlinného materiálu (mortalitu) na médiích.

## Doporučený rozsah práce

30-40 stran

## Klíčová slova

Rostlinné regulátory růstu, organogeneze, multiplikace, zakořeňování

---

## Doporučené zdroje informací

- Almeida, R., Goncalves, S., Romano, A., 2005. In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation*, 14 (5): 1059-1069.
- Bari R., Jones J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69 (4): 473-488.
- Brand, M.H., Kiyomoto, R., 1999. Redevelopment of tissue proliferation symptoms in rooted rhododendron cuttings. *Hortscience*, 34 (4): 723-726.
- Jain S. M., Häggman H., 2007. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. 569 p. ISBN 978-1-4020-6351-0
- Mao, A. A., Kaliamoorthy, Seenthilingam, Ranyaphi, R. A., et al., 2011. In vitro micropropagation of three rare, endangered, and endemic rhododendron species of Northeast India. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47 (6): 674-681.
- Pavingerova, D., 2009. The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron*. *Biologia Plantarum*, 53 (4): 797-799.
- Sivanesan, Iyyakkannu, Jeong, Byoung Ryong, 2013. MICROPROPAGATION OF RHODODENDRON KEISKEI VAR. HYPOGLAUCUM SUTO & SUZUKI AND ASSESSMENT OF CLONAL FIDELITY OF PLANTLETS BY RAPD. *Propagation of Ornamental Plants*, 13 (3): 123-129.
- Tomson, S., Gertner, D., 2003. In vitro shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*. *Biologia Plantarum*, 46 (3): 463-465.
- Vejsadova, H., 2008. Growth regulator effect on in vitro regeneration of rhododendron cultivars. *Horticultural Science*, 35 (2): 90-94.
- Zaytseva, Yulianna G., Poluboyarova, Tatyana V., Novikova, Tatyana I., 2016. Effects of thidiazuron on in vitro morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. *Grandiflorum* leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52 (1): 56-63.
- 

## Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FLD

## Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

## Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 5. 5. 2016

**prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 27. 1. 2017

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Děkan

V Praze dne 13. 04. 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Mikropropagace pěnišníku daurského (*Rhododendron dauricum* L.) pomocí in vitro metod vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 13. dubna

Lucie Hartingerová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

A také děkuji doc. Ing. Danielu Zahradníkovi, Ph.D. za odborné konzultace při vyhodnocování výsledků laboratorních pokusů.

## Abstrakt

V první části této práce je popsán rod *Rhododendron* a druh *Rhododendron dauricum* L.

Dále jsou shrnuty výhody kultivace v in vitro podmínkách a přehled hlavních skupin rostlinných regulátorů.

Následuje popis metod a postupů při laboratorní části práce.

Během vypracovávání této práce byl zkoumán vliv cytokininů a auxinů na explantáty pěnišníku daurského ve sterilních podmínkách in vitro. Jako médium pro multiplikační i zakořeňovací média bylo použito Andersonovo kultivační médium (Anderson, 1984).

Dále byly vyhodnoceny a zjištěny výsledky osmi týdenního pozorování.

Explantáty pěnišníku daurského nejlépe reagovaly na multiplikační médium RD + 4 2iP + 0,2 IBA; bohužel žádné ze zakořeňovacích médií nestimulovalo růst kořenů u tohoto druhu.

Klíčová slova: rostlinné regulátory růstu, organogeneze, multiplikace, zakořeňování

## Abstract

In the first part of this paperwork genus *Rhododendron* and the specie *Rhododendron dauricum* L. are described.

Advantages of *in vitro* micropropagation and specification of plant hormones follow.

Then methods and materials for work in the laboratory are mentioned.

The influence of cytokinins and auxins on the explants of *Rhododendron dauricum* L. were observed, working in *in vitro* conditions.

Anderson's medium was used for multiplication and rooting of all explants (Anderson, 1984).

The experiment was performed in 8 weeks.

Afterwards, data were collected.

The most successful multiplication medium consisted 4 2iP + 0,2 IBA.

Unfortunately none of rooting mediums triggered root growth.

Keywords:

Plant growth regulators, organogenesis, multiplication, rooting



## Obsah

1) Úvod .....	11
2) Cíle práce .....	12
3) Rhododendron spp. ....	13
1) Rhododendron dauricum .....	14
1) Rhododendron dauricum subs. sichotense .....	14
4) Regenerace in vitro .....	15
5) Regulátory rostlinného růstu .....	16
1) Auxiny .....	16
2) Gibbereliny .....	17
3) Cytokininy .....	17
4) Kyselina abscisová .....	18
5) Etylen .....	18
6) Metodika a materiály .....	19
1) Rostlinný materiál .....	19
2) Příprava rostlinného materiálu .....	19
3) Příprava médií .....	20
4) Práce s explantáty .....	22
5) Multiplikace .....	23
6) Zakořeňování .....	23
7) Výsledky pokusu .....	24
1) Multiplikační média .....	24
2) Zakořeňovací média .....	26
8) Diskuze .....	28
9) Závěr.....	30
10) Seznam literatury a použitých zdrojů .....	31

## Seznam tabulek, obrázků, grafů

Tabulka 1) Chemické složení Andersonova kultivačního média .....	21
Tabulka 2) Vliv cytokininu 2iP a auxinu IBA na počet a délku prýtů .....	24
Tabulka 3) Vliv auxinu IBA a NAA na počet a délku prýtů .....	26
Obrázek 1) Rhododendron dauricum L. ....	14
Obrázek 2) Explantáty před zahájením pokusu .....	20
Obrázek 3) Sterilní sklenice s explantáty .....	22
Obrázek 4) Explantáty v zakořeňovací médiu, během pozorování.....	23
Obrázek 5) Výsledek růstu explantátů na médiu RD + 4 2iP + 0,2 IBA .....	25
Obrázek 6) Explantáty z média RD + 0,3 IBA .....	27

## **Seznam použitých zkratek**

IAA - kyselina indolyl-3-octová

IBA - kyselina indolyl-3-máselná

KOH - hydroxid draselný

NAA - kyselina naftyloctová

2iP - 2-isopentenyladenin

4-chlor-IAA - kyselina 4-chlor-indolyloctová

PAA - kyselina fenylloctová

RD - Andersonovo kultivační médium

MS - Murashige - Skoog kultivační médium

Tukey HSD - Tukey honest significant difference

## 1) Úvod

Mikropropagace in vitro (ve skle), je metoda, která umožňuje studium a rozmnožování rostlin v laboratorním sterilním prostředí.

Pracuje se s živnými médii, minerály, vitamíny a rostlinnými hormony.

Výsledkem úspěšné mikropropagace jsou nové kořeničky rostliny (klony mateřské rostliny), které jsou schopné být přeneseny do nesterilních podmínek ex vitro a přežít v nich.

Tato metoda se dnes využívá při záchraně některých druhů (též u rodu *Rhododendron*, z důvodu kritického ohrožení některých druhů žijících ve volné přírodě); ale také nachází široké uplatnění v zahrádkářství (Mao et al., 2011; Vejsadová, 2008).

Pěnišník daurský (*Rhododendron dauricum*) je poměrně rozšířený druh z oblasti od Sibíře, přes pohoří Altaj, až po ostrov Sachalin.

Kvůli své odolnosti k chladným teplotám jsou některé jeho kultivary využívány v zahradnictví jako okrasné keře nebo se vysazují do volné přírody (University of St. Andrews, 2011).

Smyslem této práce je vypracování literární rešerše k tomuto druhu a provedení laboratorního pozorování, zaměřeného na vliv auxinů a cytokininů na jeho růst a vývoj.

## 2) Cíle práce

Cílem této práce je vyhodnocení vlivu cytokininů a auxinů na explantáty pěnišníku daurského (*Rhododendron dauricum*), za použití Andersonova kultivačního média (RD) (Anderson, 1984).

V první části bude přiblíženo zařazení druhu, jeho přirozený výskyt, stanovištní nároky a využití. Poté bude následovat postup práce při mikropropagaci pomocí in vitro metod. Dále popis vybavení laboratoře, přípravy kultivačních médií a práce s explantáty v aseptických podmínkách. Konkrétně bude pozorován vliv cytokininu 2-isopentenyladeninu (2iP) a auxinů kyseliny indolyl-3-máselné (IBA) a kyseliny naftyloctové (NAA) na explantáty.

Kontrolní médium bude připraveno bez fytohormonů. Dále bude srovnáváno s pěti multiplikačními kultivačními médii a šesti zakořeňovacími. Dávky cytokininu 2iP budou v RD médiu různě vysoké a některé koncentrace budou navíc obohaceny o auxin IBA nebo NAA.

*Rhododendron dauricum* patří mezi poměrně rozšířené druhy a jeho kultivary nacházejí uplatnění, kromě vysazování do divoké přírody, také v zahradnictví, jako okrasné keře v parcích a zahradách.

Obecným cílem mikropropagace tohoto druhu je tudíž také zefektivnění pěstebního procesu. Získání co nejvyššího počtu kvalitních rostlin s využitím těch fytohormonů, které tomuto konkrétnímu druhu vyhovují nejvíce. Pochopitelně během této práce není možné vyzkoušet všechny možné cytokininy, auxiny a jejich kombinace. Navíc je možné pracovat s explantáty pěnišníku daurského také na upraveném MS médiu (Murashige, Skoog, 1962). V této práci ale bude použito výhradně RD médium.

### 3) *Rhododendron* spp.

Rod *Rhododendron* je největším v čeledi Ericaceae a zahrnuje kolem 1000 až 1200 známých druhů.

Dělí se do osmi podrodů, z čehož jsou nejdůležitější následující čtyři. *Tsutsusi* (stálezelené azalky, zahrnující 117 druhů) a *Pentanthera* (opadavé azalky, zahrnující 30 druhů), ze kterých pochází velké množství kříženců zahradních a pokojových azalek. A dále podrody *Rhododendron* a *Hymenanthes*, které mají dohromady kolem 800 druhů, a které se volně označují jako zahradní rododendrony (Eeckhaut et al., 2010).

Ve volné přírodě je tento rod rozšířen v severovýchodní Ásii.

Dále zasahuje do Eurázie, západní Evropy a severní Ameriky.

Je schopný růstu v nadmořských výškách od 1200 do 6000 m n.m.

Ačkoli většina druhů se vyskytuje v rozmezí 2200 až 4000 m n.m. (Mao et al., 2011).

Ve velké většině se jedná o ohrožené druhy. V roce 2011 se ocitlo 25% všech druhů rodu *Rhododendron* pod hrozbou úplného vymizení z volné přírody (Sivanesan, Jeong, 2013).

Kvůli konstantním negativním dopadům na ekosystém, se (například v Indii, kde se 98% druhů vyskytuje v Himalájích) zhoršují přirozené podmínky pro tento rod, čímž se z některých druhů stávají ohrožené, silně ohrožené nebo kriticky ohrožené druhy (Mao et al., 2011).

Tyto rostliny upřednostňují polostín, dostatek vlhkosti a kyselější pH půdy (4,5 až 5,5).

Množství okrasných druhů a kultivarů je vysazováno v parcích a zahradách. Avšak jejich pěstování běžnými metodami (pěstováním ze semen, řízkováním, atd.) bývá obtížné nebo neefektivní (Vejsadová, 2008).

Klonální mikropropagace je proto vhodnou metodou pro získání velkého počtu nových rostlin (Zaytseva, 2016).

Regenerace pomocí růstových regulátorů je specifická podle konkrétního druhu nebo kultivaru (Pavingerová, 2009).

### 3.1) *Rhododendron dauricum* L.

Poprvé jej popsal Carl Linné (1707-1778).

Druhé jméno odkazuje na jednu z oblastí výskytu, Daurii na jihovýchodní Sibiři (dnešní Zabajkalsko).

Jedná se o hustý, poloopadavý keř, dosahující výšky kolem dvou metrů.

Je velice odolný a vydrží teploty až do  $-32^{\circ}\text{C}$ . Kvete sytě růžovými květy brzy na jaře (březen, duben) (obrázek 1). Listy jsou silné a mají zakulacené špičky.

Přírodně se vyskytuje na území od Altajských hor na východní Sibiři, přes Mongolsko, ostrov Sachalin, severní Čínu až po Japonsko (University of St. Andrews, 2011).



Obrázek 1) *Rhododendron dauricum* L.

#### 3.1.1) *Rhododendron dauricum* subsp. *sichotense*

Původní druh v Rusku na dálném východě. Má větší květy než *R. dauricum* a je neopadavý. Kvůli mrazuvzdornosti, hustému olistění a velkým květům se vysazuje do volné přírody ve Finsku.

(University of St. Andrews, 2011).

#### 4) Regenerace in vitro

Tato metoda umožňuje dlouhodobě studovat regeneraci izolovaných částí rostlin ve sterilním prostředí baněk, zkumavek, Petriho misek atd.

Izolované části rostlin se nazývají explantáty. Tato problematika je známá pod názvem explantátové kultury.

Explantáty mohou být ovlivňovány složením kultivačního média, světlem, teplotou, případně i složením atmosféry.

K jakému jevu dojde, závisí vedle kultivačních podmínek také na vlastním explantátu. Rozhodujícími faktory, které nesou explantáty jsou genotyp a fyziologický stav v době odběru.

Totipotence je schopnost jakékoli plnohodnotné rostlinné buňky dát vznik nové celistvé rostlině. Tato vlastnost je nejtypičtější pro zygotu. U ostatních buněk je podmínkou totipotence nepoškozená genetická informace. Tato vlastnost se projevuje u buněk embryonálních, meristematických a u buněk s minimálním stupněm diferenciací.

Morfogeneze (vznik a vývoj organizovaných struktur) a regenerace probíhají v podmínkách in vitro dvěma způsoby. Zaprvé organogenezi, při které vznikají pouze orgány nebo jejich soubory, nikoli však celistvá rostlina. Druhým způsobem je embryogeneze, při které postupnými strukturálními změnami vzniká z jedné buňky zárodek. Technika explantátových kultur má dnes značný praktický dopad. Uplatňuje se například při vysoce efektivním rozmnožování okrasných rostlin, ovocných dřevin nebo keřů. (Rosypal et al., 2003)



## **5) Regulátory rostlinného růstu**

Mezi regulátory rostlinného růstu patří fytohormony a dále další látky s regulační aktivitou.

Domněnku, že jsou v rostlinách tvořeny orgánotvorné látky poprvé vyslovil německý botanik Julius von Sachs (1832-1897) v roce 1880. Do té doby byl vývoj rostlin spojován pouze s vlivy okolního prostředí (Rosypal et al. 2003).

V jeho práci významně pokračoval brněnský profesor Rudolf Dostál (1885-1973) (Šebánek, 2007).

Ve dvacátých letech 20. století se výzkumy zaměřily na růstové látky v rostlinách, které později dostaly název fytohormony.

Rostlinné hormony jsou organické sloučeniny, účinné v nízkých koncentracích. Vyvolávají biochemické, fyziologické nebo morfologické reakce, a to v místě svého vzniku, nebo v místě, kam byly transportovány. Mají také zásadní význam v imunitní obraně rostlin (Bari, Jones, 2009).

Od živočišných hormonů se liší tím, že nejsou tvořeny ve specializovaných skupinách buněk. U rostlin neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován pouze jedním fytohormonem. Zároveň každý fytohormon ovlivňuje více fyziologických jevů (Rosypal et al. 2003; Procházka, Šebánek et al. 1997).

Mezi regulátory rostlinného růstu jsou řazeny fytohormony (auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselina abscisová, etylen) a další látky s regulační aktivitou (kyselina salicylová, jasmonáty, brassinosteroidy, peptidové hormony a nově strigolaktony) (Bari, Jones, 2009; Procházka, Šebánek et al. 1997).

### **5.1) Auxiny**

Jsou nejdéle známými fytohormony a jejich název je odvozen od řeckého slova auxein (prodlužovat se) (Procházka, Šebánek, 1997).

Auxiny se tvoří především ve vegetačním vrcholu, v nejmladších listech,

v kambiu a v oplozeném vajíčku. V rostlině se pohybují bazipetálně, tj. od vrcholu lodyhy k její bázi. Podporují především prodlužování buněk, vznik plodů bez předchozího oplození, zakořeňování řízků a hrají důležitou roli v apikální dominanci. Ve vyšších koncentracích, v důsledku zvýšené tvorby etylenu, zpomalují růst a působí toxicky (Rosypal et al., 2003).

Dělí se na auxiny přirozené a syntetické látky s účinkem auxinu.

Mezi čtyři hlavní přirozené auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlor-indolyloctová (4-chlor-IAA) a kyselina fenylloctová (PAA).

Syntetické látky s účinkem auxinu lze rozdělit do pěti skupin.

Indolové kyseliny, naftalenové kyseliny, chlorfenoxylové kyseliny, benzoové kyseliny a deriváty kyseliny pikolinové (Procházka, Šebánek, 1997; Rosypal et al., 2003).

## **5.2) Gibbereliny**

Gibbereliny jsou produkovány nejmladšími listy, semeny a kořeny. Transport je bazipetální i akropetální, často k místu tvorby auxinu. Podporují růst, prodlužování buněk, přerušují dormanci (odpočinek rostlin) a indukují syntézu enzymů v aleuronové vrstvě klíčící obilky. Na rozdíl od auxinů, stimulují dlouhivý růst pouze v nadzemních částech rostliny a ve vyšších koncentracích nepůsobí na rostliny toxicky (Procházka, Šebánek, 1997; Rosypal et al., 2003).

## **5.3) Cytokininy**

Jsou definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu stimulují v některých částech rostlin buněčné dělení a zahajují diferenciaci pupenů nebo kořenů (podle poměru cytokininu k auxinu).

Jsou nezbytné pro dělení buněk, ruší apikální dominanci, zpomalují stárnutí rostlinných pletiv a orgánů, zvyšují odolnost rostlin k extrémním podmínkám okolního prostředí a podporují tvorbu semen.

Přirozené cytokininy jsou odvozeny od čtyř základních substitucí adeninu

v poloze N-6 a jsou to: N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -izopentenyl)adenin; cis-zeatin, trans-zeatin; dihydrozeatin; N<sup>6</sup>-benzyladenin (Procházka, Šebánek, 1997; Rosypal et al., 2003).

#### **5.4) Kyselina abscisová**

Kyselina abscisová (ABA) je produkována zejména stárnoucími listy, odkud je transportována do ostatních částí rostliny. Navozuje dormanci pupenů a semen, podporuje opad listů a plodů, brzdí klíčení a rašení, ovlivňuje pohyby svěřacích buněk průduchů atd.

#### **5.5) Etylen**

Etylen brzdí prodlužování buněk, stimuluje dozrávání plodů a klíčení semen, urychluje stárnutí listů a jejich opad. Podporuje zrání plodů, semen a rašení pupenů. Produkce etylenu se zvyšuje u rostlin stresovaných (např. poraněním, suchem apod.) a u rostlin ošetřených auxinem. (Rosypal et al., 2003).

## **6) Metodika a materiály**

### **6.1) Rostlinný materiál**

Rostlinným materiálem pro založení explantátové kultury obecně mohou být spory, pylová zrna, zárodky, semena, orgány, pletiva, buňky nebo protoplasty (Rosypal et al., 2003). U Rhododendronu se explantáty nejčastěji získávají ze semen (Mao et al., 2011), listů, květů (Tomsone, Gertnere, 2003) nebo vrcholových a bočních pupenů (Almeida et al., 2005).

### **6.2) Příprava rostlinného materiálu**

Materiál získaný z mateřské rostliny musí projít sterilizací. Odříznutá část rostliny (v tomto případě prýty s pupeny) se ponoří na 20 minut do koncentrátu dezinfekčního prostředku (např. SAVO, 25-30ti procentní roztok), který obsahuje 1,5 - 5% roztok chlornanu sodného (NaOCl) a poté se třikrát omyje sterilizovanou destilovanou vodou. (Almeida et al., 2005; Vejsadová, 2008)

Materiál pro tuto práci byl poskytnut z laboratoře České zemědělské univerzity v Praze, v arboretu Truba, Kostelec nad Černými lesy.

Explantáty byly umístěny na Andersonovo médium (RD) (Anderson, 1984), obohaceném o sacharózu 30g/l, agar 8 g/l, cytokinin 2iP 10mg/l a auxin IBA 0,1 mg/l.

Rozdělením na menší části a následným pěstováním na multiplikačním médiu, bylo dosaženo zvětšení množství rostlinného materiálu, potřebného pro výzkumnou část práce.

Pro zahájení pokusu bylo potřeba, aby prýty na rostlinách měly alespoň 1cm délky (obrázek 2). V množství, minimálně 25 explantátů pro plánovaných 12 pokusných médií, tedy zhruba 300 prýtů. Po dosažení potřebného počtu, byla připravena testovací pokusná RD média s příslušnými dávkami cytokininů a auxinů.

Řízky rostlin byly po celou dobu pěstovány ve speciální místnosti

s kontrolovanou teplotou a světelností. Teplota byla stanovena na 22°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Fotoperioda chladného bílého fluorescentního světla byla stanovena na 16 hodin světla / 8 hodin tmy.

Během celého pokusu se měnily pouze hodnoty fytohormonů, všechny ostatní hodnoty zůstaly beze změny tak, jak jsou uvedeny v tabulce dále.



Obrázek 2) Explantáty před zahájením pokusu

### 6.3) Příprava médií

Do skleněné kádiny byly za průběžného míchání přidány makronutrienty, mikronutrienty, vitamíny a minerály tak, jak jsou uvedeny za sebou v tabulce 1. Po přidání 30g sacharózy byl obsah kádiny důkladně promíchán a přes odměrný válec bylo zjištěno přesné množství roztoku. Poté byla doplněna destilovaná voda na požadované množství, a nakonec byly přidány fytohormony.

Pomocí digitální sondy pro měření pH, bylo zjištěno pH roztoku. Přidáním několika kapek ve vodě rozpuštěného hydroxidu draselného (KOH) nebo několika kapek ve vodě rozpuštěné kyseliny askorbové, bylo pH upraveno na hodnotu 5,5. Nakonec bylo do roztoku přidáno 8g agarů. Poté, co bylo médium vystaveno varu, bylo za stálého promíchávání přeletáno do menších

uzavíratelných sklenic o obsahu zhruba 100ml. Množství RD médií ve sklenicích se pohybovalo v rozmezí 20-25ml. Sklenice byly uzavřeny plastovými víčky s průduchem uprostřed, do kterého byla vložena bílá vata, aby nedošlo ke kontaminaci. Takto připravená média byla umístěna do autoklávu a sterilována na 121°C po dobu 15ti minut.

<b>Složení Andersonova RD média</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
KNO <sub>3</sub>	480
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	332,02
MgSO <sub>4</sub>	180,54
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	330,6
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	73,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
Thiamine HCl	1
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
myo-Inositol	100
Casein	200
L-Glutamine	200
sacharóza	30 g/l
pH	5,5
agar	8 g/l

Tabulka 1) Chemické složení Andersonova kultivačního média

#### 6.4) Práce s explantáty

Manipulace s explantáty probíhala ve sterilním prostředí ve flowboxu.

K práci byly používány laboratorní pinzety a nůžky, Petriho misky, kahan s líhem a sklenice s líhem pro sterilizaci pomůcek.

Před začátkem práce byla celá pracovní plocha flowboxu ošetřena roztokem etanolu, kvůli dezinfekci. Pinzety a nůžky byly ponořeny do líhu a sterilizovány nad plamenem kahanu. Do jedné sklenice s 20-25ml kultivačního média byly nasazeny 3 rostliny (obrázek 3).

Okraj sklenice a vnitřní strana víčka byly sterilizovány nad plamenem a sklenice s explantáty byla uzavřena.



Obrázek 3) Sterilní sklenice s explantáty

### 6.5) Multiplikace

Při multiplikaci byl sledován vliv cytokininu 2-isopentenyladeninu (2iP), samostatně nebo s auxinem, kyselinou indolyl-3-máselnou (IBA), na explantáty *Rhododendronu dauricum*. A to v hodnotách [mg/l]: 4 2iP + 0,2 IBA; 7 2iP; 7 2iP + 0,2 IBA; 10 2iP; 10 + 0,2 IBA.

Délka pozorování byla 8 týdnů.

(Mao et al., 2011, Eeckhaut et al. 2010)

### 6.6) Zakořeňování

Pro zakořeňování byly použity auxiny IBA a NAA.

V hodnotách [mg/l]: 0,3 IBA; 0,7 IBA; 1 IBA; 1 IBA + 0,2 NAA; 1 IBA + 0,4 NAA; 2,5 IBA.

Explantáty byly na kultivační média umístěny po třech (obrázek 4).

Délka pozorování explantátů byla 8 týdnů. (Mao et al., 2011)



Obrázek 4) Explantáty v zakořeňovací médiu, během pozorování



## 7) Výsledky pokusu

Po osmi týdnech po přesazení explantátů na kultivační média, byla vyhodnocena data. Celkem bylo hodnoceno pět multiplikačních médií, šest zakořeňovacích a kontrolní médium bez fytohormonů. Počet rostlin na jeden pokus byl stanoven na dvacet pět.

### 7.1) Multiplikační média

V multiplikačních médiích bylo použito celkem pět různých koncentrací cytokininu 2iP (2-isopentenyladenin) a auxinu IBA (kyselina indolyl-3-máselná). Byl zjišťován vliv na růst prýtů a jejich množství.

Byla stanovena hypotéza  $H_0$ , že všechna média mají stejný účinek a hypotéza  $H_1$ , že alespoň jedno médium má jiný účinek na délku a počet prýtů.

Po zjištění hodnot  $F > F_{crit}$ . byla vyvrácena  $H_0$  a přijata hypotéza  $H_1$ .

Dále bylo nutné vyhodnotit, která ze skupin signalizuje významnou odchylku průměru.

Na hladině významnosti  $\alpha = 5\%$  byly pomocí Tukeyova testu (Tukey HSD) zjištěny následující hodnoty (tabulka 2).

Tabulka 2) Vliv cytokininu 2iP a auxinu IBA na počet a délku prýtů

Množství fytohormonů [mg/l]	Průměrný počet prýtů [ks]	Průměrná délka prýtů [mm]
0 2iP + 0 IBA	1,04 ± 0,04f	14,24 ± 0,44a
4 2iP + 0,2 IBA	11,32 ± 0,21g	19,92 ± 0,29b
7 2iP	3,36 ± 0,17d	12,16 ± 0,38c
7 2iP + 0,2 IBA	5,44 ± 0,27e	14,60 ± 0,31a
10 2iP	5,92 ± 0,16e	15,16 ± 0,16a
10 2iP + 0,2 IBA	3,56 ± 0,15d	15,00 ± 0,21a

U hodnot se stejnými písmeny neexistuje statisticky významný rozdíl; podle Tukeyova HSD testu ( $P = 0,05$ ). Hodnoty jsou průměrem 25 vzorků ± SE. ( $df = 149$ )

U multiplikačních médií nejlépe vyšlo, podle průměrného počtu prýtů i podle průměrné délky prýtů, RD médium s fytohormony 4 2iP + 0,2 IBA a dále RD médium s cytokininem 2iP v množství 10mg/l.

Rostliny na obou těchto kultivačních médiích vykazovaly vysokou životaschopnost. V obou případech přežilo 100% sledovaných rostlin.

Vedlejší prýty na vzorcích 10 2iP a 4 2iP+0,2 IBA (obrázek 5) byly krátké, husté a těžko spočítatelné.



Obrázek 5) Výsledek růstu explantátů na médiu RD + 4 2iP + 0,2 IBA

Stoprocentní životnost byla zjištěna ještě u média RD + 10 2iP + 0,2 IBA. Na těchto explantátech, ale bylo pozorováno méně prýtů.

Nejvíce odumřelých rostlin (68%) bylo zjištěno na kontrolním médiu RD + 0 2iP + 0 IBA.

Na médiích RD + 7 2iP a RD + 7 2iP + 0,2 IBA bylo zjištěno 88% a 84% přeživších explantátů.

## 7.2) Zakořeňovací média

U zakořeňovacích médií byl pozorován vliv auxinů IBA a NAA na tvorbu a růst kořenů.

Spontánní zakořeňování nebylo pozorováno u žádné rostliny a ani žádné použité množství auxinů nestimulovalo růst kořenů u explantátů (obrázek 6).

Po osmi týdnech pozorování bylo možné měřit pouze hodnoty počtu a délky prýtů (tabulka 3).

Tabulka 3) Vliv auxinu IBA a NAA na počet a délku prýtů

Množství fytohormonů [mg/l]	Průměrný počet prýtů [ks]	Průměrná délka prýtů [mm]	% životaschopných explantátů
0 2iP + 0 IBA	1,04 ± 0,04e	14,24 ± 0,44a	68%
0,3 IBA	2,44 ± 0,10f	13,88 ± 0,17ab	76%
0,7 IBA	2,72 ± 0,19f	14,36 ± 0,41abc	100%
1 IBA	1,36 ± 0,09eg	15,88 ± 0,58cd	80%
1 IBA + 0,4 NAA	1,04 ± 0,04egh	11,52 ± 0,23f	60%
2,5 IBA	1,20 ± 0,81egh	15,28 ± 0,30abcd	68%

U hodnot se stejnými písmeny neexistuje statisticky významný rozdíl; podle Tukeyova HSD testu (P = 0,05). Hodnoty jsou průměrem 25 vzorků ± SE. (df = 149)

U média RD + 1 IBA + 0,2 NAA došlo ve druhém týdnu pozorování z neznámého důvodu ke kontaminaci 80% vzorků a po ukončení pokusu vykazovaly zbývající explantáty začínající nebo mírně pokročilou nekrózu. Proto není toto médium zahrnuto do tabulky 3.

U ostatních médií se u několika explantátů projeví nekrózy. Procenta přežití byla o něco nižší než u multiplikačních médií.

### Statistické analýzy

Jednovýběrovou analýzou rozptylu (ANOVA) bylo zjišťováno, zda jsou průměry jednotlivých výsledků rozdílné vlivem různých středních hodnot příslušných médií, nebo lze rozdíly mezi průměry přičíst náhodnému kolísání.

Všechna data byla podrobena statistické analýze rozptylu (jednovýběrová analýza rozptylu; ANOVA). Data byla zpracována v programu SPSS Statistics (společnost IBM Analytics; verze 24).



Obrázek 6) Explantáty z média RD + 0,3 IBA

## 8) Diskuze

Tématem této bakalářské práce byla mikropropagace pěnišníku daurského (*Rhododendron dauricum* L.) pomocí in vitro metod.

Jejím cílem bylo vypracování literární rešerše na téma množení pěnišníku daurského pomocí in vitro metod. A dále se zaměřit na růst kultur ve fázi multiplikace, zakořeňování a přesazení do nesterilních podmínek.

V první části práce je popsán rod *Rhododendron* a druh *Rhododendron dauricum* L.

Micropropagace *Rhododendron* spp. se zkoumá více v zahraničí, než u nás. Je to hlavně z důvodu, že jejich původní stanoviště se nachází hlavně v oblasti centální Ásie, v Himalájích, a zahrnuje několik států, například Nepál, Čínu, Mongolsko, Japonsko, Kazachstán, Rusko, a další.

V Evropě se někteří zástupci tohoto rodu volně vyskytují na Pyrenejském poloostrově, jako třetihorní relikty. Patří sem například *Rhododendron ponticum* (Almeida et al., 2005).

Dále následuje charakteristika metod in vitro, rostlinných regulátorů a laboratorních postupů při získávání a sterilizování explantátů.

Poté jsou hodnoceny výsledky vlastního pokusu, který probíhal v laboratoři České zemědělské univerzity v Praze, v areálu arboreta Truba, v Kostelci nad Černými lesy.

Ve vlastním pokusu byl sledován vliv cytokininů a auxinů na explantáty pěnišníku daurského. Jako kultivační médium bylo použito Andersonovo médium (Anderson, 1984). Dále byly použity různé koncentrace cytokininu 2iP a auxinů IBA a NAA.

Multiplikační i zakořeňovací média s fytohormony byla srovnávána s kultivačním RD médiem bez fytohormonů.

Celý pokus trval osm týdnů a bylo pozorováno 12 kultivačních médií, přičemž počet rostlin pro každé médium byl 25.

Množství cytokininu 2iP a auxinu IBA v multiplikačních médiích byly explantáty přijaty dobře, což se projevilo na délkách a počtech prýtů

explantátů. Nejlepších výsledků dosáhlo médium RD + 4 2iP + 0,2 IBA, které také vykazovalo nejvyšší možnou životaschopnost. Přežilo 100% explantátů.

Použité množství fytohormonů na zakořeňovacích médiích se neseťkalo s očekávanou odezvou explantátů pěnišníku daurského. Na žádném z použitých kultivačních médií nebyl pozorován růst kořenů.

Zahájení růstu kořenů je v případě in vitro metod klíčovým okamžikem.

Nezakořeněné explantáty nejsou schopny samostatně přežít v podmínkách ex vitro.

Možným řešením by pro stimulaci růstu kořenů mohlo být použití 1/2 RD média s auxinem IBA nebo NAA. Nižší koncentrace živin v médiu by mohly být lehkým stresovým faktorem pro explantáty.

Dalším možným řešením by mohlo být použití jiného auxinu nebo jiné kombinace rostlinných regulátorů v zakořeňovacím médiu, například IAA.

Každý druh reaguje na použité fytohormony odlišně. Nejčastěji testované cytokininy u rodu *Rhododendron* jsou 2iP, zeatin a thidiazuron. Z auxinů to jsou IAA, NAA IBA. Velké množství odborných publikací se zabývá srovnáváním výsledků stejných koncentrací fytohormonů na několik různých druhů nebo kultivarů. Při použití stejných koncentrací rostlinných regulátorů na různé druhy *Rhododendron* spp. je lépe patrné, které konkrétní fytohormony vyhovují konkrétním druhům nebo kultivarům. (Vejsadová, 2008; Pavingerová, 2009; Tomson, Gertner, 2003).

Někteří autoři uvádějí výsledky úspěšné mikropropagace, které dosáhli s pomocí modifikovaného MS média (Murashige, Skoog, 1962), kterým nahradili RD médium, které se pro mikropropagaci *Rhododendron* spp. používá častěji (Eeckhaut et al., 2010; Vejsadová, 2008).

Jinak také na médium reagují opadavé a stálezelené druhy (*Rhododendron dauricum* je poloopadavý) (Eeckhaut et al., 2010).

Optimálních výsledků mikropropagace pěnišníku daurského dosáhly Y.G. Zaytseva a T.I. Novikova, kdy bylo na multiplikaci použito RD médium (se zeatinem; zeatinem a IAA; thidiazuronem) a zakořeňování proběhlo dvěma

způsoby. Zaprvé: šest týdnů kultivace na RD médiu s auxinem IBA. Zadruhé: namočením explantátů na 4 hodiny do roztoku, obsahující auxin IBA a následným umístěním do podmínek ex vitro na směs rašeliny a písku v poměru 1:1. Úspěšnost zakořeňování v ex vitro podmínkách byla u pěnišníku daurského 89% (Zaytseva, Novikova, 2014).

## 9) Závěr

Cílem této práce bylo vedle literární rešerše také zkoumání vlivů růstových regulátorů na explantáty pěnišníku daurského v in vitro podmínkách.

Po osmi týdenním pozorování bylo zjištěno RD médium s dávkou fytohormonů, které tomuto druhu vyhovovalo nejvíce. Byla naměřena nejvyšší délka prýtů i jejich počet. Toto RD médium (4 2iP + 0,2 IBA) se lišilo od RD média, které posloužilo k multiplikaci před samotným zahájením pokusu (10 2iP + 0,1 IBA). Kultivační média s podobným obsahem fytohormonů (10 2iP; 10 2iP + 0,2) byla v závěrečném hodnocení jen o něco málo horší. Lze tedy říci, že pro multiplikaci pěnišníku daurského je vhodné RD médium s cytokininem 2 iP a auxinem IBA.

Naopak při použití zakořeňovacích médií nebyl stimulován růst kořenů na žádném testovaném médiu.

Všechny pokusy o zakořeňování byly prováděny v podmínkách in vitro.

Někteří autoři uvádějí dva způsoby zakořeňování, in vitro a ex vitro. (Zaytseva, Novikova, 2014). Ale také dva různé způsoby in vitro zakořeňování. Jedním z nich je vývoj explantátu na kultivačním médiu s dávkou auxinů. A druhým způsobem je ponoření bazálních konců prýtů do roztoku obsahující auxin, a následným pěstováním v in vitro podmínkách na kultivačním médiu, ale bez další dávky auxinů (Almeida et al., 2005).

Vyvstává i možnost, že na multiplikaci bylo použito jiné kultivační médium než na zakořeňování (například RD médium a modifikované MS médium, nebo jiné) (Eeckhaut et al., 2010).

## 10) Seznam literatury a použitých zdrojů

- 1) Almeida, R., Gonçalves, S., Romano, A., 2005. In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subspecies *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation*, 14 (5): 1059-1069.
- 2) Anderson, W.C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109: 343-347.
- 3) Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular Biology*, 69 (4): 473-488.
- 4) Brand, M.H., Kiyomoto, R., 1999. Redevelopment of tissue proliferation symptoms in rooted *rhododendron* cuttings. *Hortscience*, 34 (4): 723-726.
- 5) Eeckhaut, T., Janssens, K., De Keyser, E., De Riek, J., 2010. Micropropagation of *Rhododendron*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 589: 141-52.
- 6) Mao, A.A., Kaliamoorthy, Senthilingam, Ranyaphi, R.A., et al., 2011. In vitro micropropagation of three rare, endangered, and endemic *rhododendron* species of Northeast India. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47 (6): 674-681.
- 7) Murashige, T., Skoog, T.A., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- 8) Pavingerová, D., 2009. The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron*. *Biologia Plantarum*, 53 (4): 797-799.
- 9) Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., et al., 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia: 484. ISBN 80-200-0586-2.
- 10) Procházka, S., Šebánek, J., et al., 1997. *Regulátory rostlinného růstu*. Academia: 395. ISBN 80-200-0597-8.



- 11) Rosypal, S., et al., 2003. Nový přehled biologie. Scientia: 797. ISBN 978-80-86960-23-4.
- 12) Sivanesan, Iyyakkannu, Jeong, Byoung Ryong, 2013. MICROPROPAGATION OF RHODODENDRON KEISKEI VAR. HYPOGLAUCUM SUTO & SUZUKI AND ASSESSMENT OF CLONAL FIDELITY OF PLANTLETS BY RAPD. Propagation of Ornamental Plants, 13 (3): 123-129.
- 13) Tomsone, S., Gertner, D., 2003. In vitro shoot regeneration from flower and leaf explants in Rhododendron. Biologia Plantarum, 46 (3): 463-465.
- 14) Vejsadová, H., 2008. Growth regulator effect on in vitro regeneration of rhododendron cultivars. Horticultural Science, 35 (2): 90-94.
- 15) Zaytseva, Y.G., Poluboyarova, Tatyana V., Novikova Tatyana I., 2016. Effects of thidiazuron on in vitro morphogenic response of Rhododendron sichotense Pojark. and Rhododendron catawbiense cv. Grandiflorum leaf explants. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52 (1): 56-63.
- 16) Zaytseva, Y.G., Novikova, T.I., 2014. Clonal micropropagation of Rhododendron dauricum and Rhododendron schlippenbachii. Conference: PLANT BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL CONFERENCE, At Almaty, Kazakhstan
- 17) University of St. Andrews. *Plant of the month* [online]. St. Andrews: University of St. Andrews, 2011 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z WWW: <[https://www.st-andrews.ac.uk/~gdk/stabg\\_new/poms/2011/feb11pom.htm](https://www.st-andrews.ac.uk/~gdk/stabg_new/poms/2011/feb11pom.htm)>
- 18) Botanický ústav AV ČR. *Rhododendron - pěnišník* [online]. Průhonice: Botanický ústav AV ČR, 2016 [cit. 2016-14-5]. Dostupné z WWW: <<http://www.ibot.cas.cz/cs/vedecka-cinnost/sbirky/sbirky-botanicke-zahrady-chotobuz/rhododendron-penisnik/>>

- 19) Mustila arboretum. *Rhododendron dauricum* - *Dahurian rhododendron* [online]. Elimäki: Mustila arboretum, 2016 [cit. 2016-5-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.mustila.fi/en/taxonomy/term/389>>
- 20) Česká společnost experimentální biologie rostlin. *Historie výzkumu růstové fyziologie rostlin na ústavu botaniky VŠZ v Brně a sto let od vzniku České experimentální morfologie rostlin* [online]. Praha: Česká společnost experimentální biologie rostlin, 2007 [cit. 2017-15-3]. Dostupné z WWW: <<http://www.csebr.cz/soubory/bulletin/jaro2007/historie.pdf>>
- 21) Wikimedia.org. *File:Rhododendron dauricum3.jpg* [online]. Japonsko: Wikimedia.org, 2008 [cit. 2017-15-1]. Dostupné z WWW: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhododendron\\_dauricum3.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhododendron_dauricum3.jpg)>