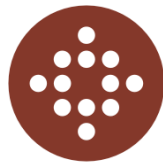


MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Zahradnická fakulta v Lednici



**Zahradnická
fakulta**

**APLIKACE RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ PRO MULTIPLIKACI
*VITIS VINIFERA L. V PODMÍNKÁCH IN VITRO***

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Martina Kudělková

Vypracovala:

Bc. Simona Mančíková

Lednice 2016

Zadání:



Zahradnická
fakulta

Mendeleum - ústav genetiky
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Simona Mančíková**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Řízení zahradnických technologií
Konzultant: Ing. Eva Ondrušiková, CSc.
Název tématu: **Aplikace růstových regulátorů pro multiplikaci *Vitis vinifera* L. v podmínkách in vitro**
Rozsah práce: 50

Zásady pro vypracování:

1. Cílem práce je využít a rozšířit informace o složení kultivačních médií určených pro multiplikaci révy vinné v podmínkách in vitro, jejichž zpracování již bylo započato v bakalářské práci studentky.
2. Na základě získaných informací budou vybrány receptury, které budou prakticky využity pro kultivaci a multiplikaci révy v podmínkách in vitro.
3. Studentka provede převod vybraných odrůd révy do aseptických podmínek a u úspěšně založených kultur budou prakticky zkoušena různá kultivační média, jejichž účinek na multiplikaci bude následně vyhodnocen.



Seznam odborné literatury:

1. Alizadeha M., Singhb S.K., Patelb V.B. 2010: Comparative performance of in vitro multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes. International Journal of Plant Production. ISSN: 1735-6814
2. DEBERGH, P. – ZIMMERMAN, R. Micropropagation : technology and application. 2. vyd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. 484 s. ISBN 0-7923-0819-0.
3. Faltus, M., Skala, O., Bilavčík, A., Zámečník, J. 2012: Kultivace révy vinné v in vitro podmínkách. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2012 ISBN: 978-80-7427-106-9
4. GEORGE, E F. – PUTTOCK, D J M. Plant culture media : Vol.1: Formulations and Uses. Edington: Exegetics Ltd., 1987. 6 s. ISBN 0-9509325-2-3.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2014

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

L. S.


Bc. Simona Mančíková
Autorka práce


Ing. Martina Kudělková
Vedoucí práce


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




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

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem práci: **APLIKACE RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ PRO MULTIPLIKACI VITIS VINIFERA L. V PODMÍNKÁCH IN VITRO** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici, dne:

.....
podpis

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala ing. Martině Kudělkové a celému personálu *in vitro* laboratoře za umožnění práce na tomto tématu a poskytnutí cenných rad při zpracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za psychickou a finanční podporu při realizaci diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ	10
3.1.1	Zařazení révy vinné podle <i>Linnaeuse</i> (1753)	10
3.1.2	Základní rozdělení rodu <i>Vitis</i> (Planchon, 1887)	10
3.1.3	Rozdělení druhu <i>Vitis vinifera</i> L. (Olmo, 1976)	11
3.1.4	Původ a historie révy vinné	11
3.1.5	Morfologie révy vinné (<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>)	12
3.1.6	Význam révy vinné	12
3.2	ROZMNOŽOVÁNÍ RÉVY VINNÉ	13
3.2.1	Způsoby rozmnožování révy vinné	13
3.3	KULTIVACE RÉVY VINNÉ V PODMÍNKÁCH <i>IN VITRO</i>	15
3.3.1	Rostlinné explantáty	15
3.3.2	Techniky kultivace explantátu révy vinné v podmínkách <i>in vitro</i>	16
3.3.3	Zásady multiplikace explantátů révy vinné v podmínkách <i>in vitro</i>	19
3.3.4	Výhody využívání rostlinných <i>in vitro</i> kultur	19
3.3.5	Nevýhody množení rostlin v podmínkách <i>in vitro</i>	19
3.3.6	Rostliny využívané při kultivaci v podmínkách <i>in vitro</i>	20
3.3.7	Růstové regulátory	20
3.3.8	Rozdělení růstových regulátorů	21
3.3.9	Nejčastěji využívané rostlinné hormony při multiplikaci <i>in vitro</i>	22
3.3.10	Méně využívané hormony z pohledu <i>in vitro</i> kultivace rostlin	27
3.4	RŮSTOVÉ REGULÁTORY A JEJICH KONCENTRACE VYUŽÍVANÉ PŘI MULTIPLIKACI <i>VITIS VINIFERA</i> L. V PODMÍNKÁCH <i>IN VITRO</i> DLE RŮZNÝCH AUTORŮ	29
4	METODIKA	33
4.1	LABORATOŘ	33
4.2	VÝBĚR A POPIS ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	33
4.2.1	Odrůda 'Müller Thurgau' 25/7 = Ryzlink rýnský x Madlenka královská	34

4.2.2	Odrůda 'Modrý Portugal' 20/52	35
4.2.3	Podnož 'Kober 5BB' = <i>Vitis Berlandieri</i> x <i>Vitis Riparia</i>	36
4.2.4	Podnož 'Crâciunel 2' 1/48 = <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>	37
4.3	SCHÉMA PŘÍPRAVY ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A PŘEVOD DO ASEPTICKÝCH PODMÍNEK	38
4.4	PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A PŘEVOD DO ASEPTICKÝCH PODMÍNEK.....	39
4.5	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ	39
4.5.1	Příprava média pro primární kultury	40
4.5.2	Příprava C0 média	40
4.5.3	Příprava C1 média	41
4.5.4	Příprava C2 média	41
4.5.5	Příprava C3 média	42
4.5.6	Příprava C4 média	42
4.6	ZALOŽENÍ POKUSU	43
4.7	PRŮBĚH POKUSU	44
5	VÝSLEDKY	46
5.1	MULTIPLIKACE EXPLANTÁTŮ NA VYBRANÝCH MÉDIÍCH V JEDNOTLIVÉM PASÁŽOVÁNÍ	46
5.2	HODNOCENÍ EXPLANTÁTŮ NA JEDNOTLIVÝCH MÉDIÍCH A VYJÁDRĚNÍ MULTIPLIKAČNÍHO KOEFICIENTU	53
5.2.1	Médium C0	53
5.2.2	Médium C1	54
5.2.3	Médium C2	55
5.2.4	Médium C3	56
5.2.5	Médium C4	57
6	DISKUZE	59
7	ZÁVĚR	62
8	SOUHRN.....	64
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66
10	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	73
11	PŘÍLOHY	76

1 ÚVOD

Vinohradnictví je jedním z nejstarších odvětví zemědělské činnosti člověka. Réva vinná doprovází člověka od nepaměti. Díky otiskům listů je zařazována do druhohor až počátku třetihor. Za dlouhá tisíciletí bylo nashromážděno velmi mnoho poznatků o její biologii, způsobu pěstování, vhodnosti ekologických podmínek a jejich působení na kvalitu plodů, které jsou hlavním produktem pro výrobu vína. Díky poloze České republiky v Evropě je velmi důležitá znalost biologie a fyziologie podnoží a ušlechtilých odrůd révy vinné, která umožňuje výběr nejvhodnějších kultivarů révy vinné, jejich kombinaci s vhodnou podnoží a optimální podmínky pěstování.

Rozmnožování rostlinného materiálu v podmínkách *in vitro* (mikrorozmnožování, multiplikace, mikropropagace) v současné době zaznamenává stále vyšší rozkvět, je využíváno v experimentálním výzkumu a v mnoho šlechtitelských, zahradnických, ale i množitelských podnicích. Oproti běžným způsobům rozmnožování révy vinné má multiplikace několik výhod. Umožňuje produkci druhů a klonů, i u rostlin, které jsou běžnými metodami rozmnožování množeny velmi pomalu, nebo vůbec. Hlavní pozitivem u multiplikace v podmínkách *in vitro* je vysoké množství zdravého rostlinného materiálu. Kultura je odvozena z velmi malých částí rostlin (stonkové segmenty, segmenty listů, prašníky, ...), proto je produkce nově vzniklých rostlin velmi vysoká. Metody *in vitro* jsou také využívány k eliminaci virů a patogenů. U mikropropagace se kromě výhod můžeme setkat s některými nevýhodami. Veškerou práci s rostlinným materiálem je třeba provádět v aseptických podmínkách, explantáty potřebují pro svou kultivaci klimatizovaný prostor, s nímž jsou spojeny vysoké náklady na provoz a vybavení laboratoře. Dalším negativem u těchto metod je poměrně vysoká pracnost a velmi často i delší doba při zakládání primárních kultur.

I přes negativa, které tyto metody mají, význam explantátových kultur stále vzrůstá. Přispívá k tomu především produkce bezvirózního materiálu. Na principu kultivace a termoterapie meristémů je založeno ozdravování rostlin od virových chorob, za účelem snížení koncentrace virů ve vzrostlém vrcholu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši, která bude vystihovat kultivaci révy vinné v podmínkách *in vitro*, především prozkoumat vhodná média obohacená o koncentrace rostlinných hormonů. Na základě získaných znalostí a informací dané poznatky využít pro kultivaci vybraných odrůd révy vinné v podmínkách *in vitro*. Po převodu rostlin do aseptických podmínek bylo cílem sledovat úspěšnost kultivace explantátů na jednotlivých médiích a výsledky vyhodnotit.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA RÉVY VINNÉ

3.1.1 Zařazení révy vinné podle *Linnaeuse* (1753)

Druh: *Vitis vinifera* – réva vinná

Rod: *Vitis* – réva

Čeleď: *Vitaceae* – révovité

Řád: *Vitales* – révotvaré

Třída: *Rosopsida* – vyšší dvouděložné

Oddělení: *Magnoliophyta* – krytosemenné

Podříše: *Tracheobionta* – cévnaté rostliny

Říše: *Plantae* – rostliny

3.1.2 Základní rozdělení rodu *Vitis* (Planchon, 1887)

Podrod *Euvitis* – počet chromozomů $2n=38$

Podrod *Muscadinia* – počet chromozomů $2n=40$

Druh *Muscadiana musnsoniana*

Druh *Muscadinia popenoi*

Druh *Muscadinia rotundifolia*

3.1.3 Rozdělení druhu *Vitis vinifera* L. (Olmo, 1976)

Poddruhy *Vitis vinifera* L.

Vitis vinifera subsp. *vinifera* (*sativa*) – označovaná někdy jako „evropská réva“, ušlechtilá forma (Zecca a kol., 2009).

Podle podmínek vývoje, biologicky a charakteristicky morfologických vlastností rozčlenil Negrul (1946) odrůdu *Vitis vinifera* subsp. *sativa* do tří skupin (lat. *proles*):

Proles occidentalis (skupina západní)

Proles pontica (skupina černomořská)

Proles orientalis (skupina východní)

Vitis vinifera subsp. *silvestris* (*sylvestris*) – divoká forma, nazývaná „lesní réva“ (Zecca a kol., 2009).

3.1.4 Původ a historie révy vinné

Vinařství je velmi často spojováno s činností klášterů v Čechách. První zmínka o vinicích v Čechách je z roku 1057 v darovací listině Svyatopluka II., který ji daroval, kolegiálnímu kostelu sv. Štěpána v Litoměřicích. Na Moravě to byla listina z roku 1101 klášteru benediktinů v Třebíči (Kraus, 2012).

Císař Karel IV. vydal v roce 1358 nařízení o zakládání vinic a tím zvýšil zájem o vinařství. Ve 14. století byly Znojmo, Hustopeče a Mikulov pokládány za jedny z největších vinařských středisek na Moravě. Vladislav Jagelonský nařídil roku 1497 zápis všech vinic do viničních gruntovních knih a zavedl kontrolu jakosti vín (Kraus, 2012; Kraus, 1993).

V roce 1654 bylo na Moravě 18 328 ha a v Čechách 3336 ha vinic. Od prvního napadení révy révokazem a houbovými chorobami na Moravě v roce 1890 plocha vinic klesala až do roku 1930. Výsadby vinic klesly na Moravě na 3870 ha. K narůstání o polovinu došlo v roce 1960 a v roce 1980 bylo u nás osázeno révovým keřem 14019 ha. Podle registračních výsledků ÚKZÚS činila plocha produkčních vinic v roce 2011

19 633, 45 ha, přičemž osázených ploch vinicemi je 17 198, 05 ha. Ostatní evidované plochy představují vykloučené plochy s právem opětovné výsadby. V roce 2014 evidoval ÚKZÚS 17 531 ha vinic (Kraus, 2012).

3.1.5 Morfologie révy vinné (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*)

Réva vinná byla podle předpokladů, původně keřovitou rostlinou, rostoucí v lesostepi, kde vyžadovala slunná místa. Při pohlcování slunných míst lesem hrozilo, že keřovitou révu zadusí. Postupem času začala vytvářet kmen a měnit se na popínavou formu révy (Kraus a kol., 2000; Kraus, 2012).

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

Nadzemní část je tvořena dřevnatými a zelenými částmi. Dřevnaté části tvoří staré, dvouleté a jednoleté dřevo, mezi staré dřevo patří kmen a kordonová ramena. Jednoleté dřevo je zdřevnatělý letorost po opadu listů s ukončenou vegetací. Na letorostu vyrůstají očka (pupeny), listy, zálisky, květenství, úponky a hrozny, které jsou tvořeny stopkou, třapinou a bobulemi (Michlovský, 2002; Pavloušek, 2011; Kraus, 2012).

Většina kořenů révy vinné, především jemných (kořenové vlášení), bývá často v horní části půdního profilu (0,5 – 0,9 m). Hlavní kořeny v závislosti na mateční hornině, hloubce podzemních vod nebo typu půdy mohou prorůst až do hloubky 30 m (Galet, 2000).

3.1.6 Význam révy vinné

Člověk zná a využívá révu vinnou od dávných dob, plody využíval, jako doplněk stravy. Brzy zjistil, že má prospěšné účinky pro organismus. Díky římským spisovatelům víme, že hrozny lidé využívali jako léčivo proti zácpě a jiným problémům. Révu vinnou pěstujeme kvůli plodům, které mají všestranné využití. Bobule tvořící

hrozny se především v naší zemi využívají pro výrobu vína. Hrozny je však také možné využít na výrobu různých nápojů či pokrmů (Dohnal a Kraus, 1968).

Kraus a Hubáček, (1982) rozdělují vína na tichá vína – červená, bílá, růžová vína; speciální vína – tokajská, perlivá, šumivá, dezertní a aromatizovaná vína. Dle Dohnala a Krause, (1972) jsou hrozny vhodné pro přímý konzum, na výrobu kompotů, sirupů a moštů. Ze semen lze vyrobit olej, nebo mouka, z matolin vysrážením vinanu vápenatého kyselina vinná, hroznové výlisky mohou sloužit, jako krmivo pro dobytek. Matoliny lze také využít pro tvorbu destilátů. (Kováč a kol., 1990) Tripathi a kol., (2014) popisuje využití listů révy vinné v gastronomii jako součást salátů a závitků.

3.2 ROZMNOŽOVÁNÍ RÉVY VINNÉ

Rožmnožování révy vinné a jejích podnoží je potřebné pro zachování neustálé reprodukce produkčních ploch podnožových a ušlechtilých vinic. Množení je také důležité pro vědecké zkoumání znaků a vlastností, existujících druhů a odrůd, pro zachování stávajícího genofondu a pro potřeby vyšlechtění nových odrůd (Hronský a kol., 2000).

Révu vinnou lze rozmnožovat vegetativně, nebo generativně. V procesu šlechtění nových odrůd je množena generativně, pomocí semen. Od počátků domestikace je v praxi využíván vegetativní způsob. Ve 2. polovině 19. století, před zavlečením révokazu, byla jedna odrůda révy roubována na druhou, nebo byla pěstována jako pravokořenná. Po úspěšném šlechtění rezistentních odrůd je réva vinná rozmnožována výhradně roubováním (Pavloušek, 2011).

3.2.1 Způsoby rozmnožování révy vinné

3.2.1.1 Generativní rozmnožování (pohlavní množení)

Způsob generativního množení je typický pro druhy, jako jsou *Vitis amurensis*, *Vitis riparia* (*V. odoratissima*), *Vitis labruska*, *Vitis coignetiae* (Walter, 1997).

Tento způsob je využíván při šlechtění nových odrůd révy vinné. Rostliny jsou rozmnožovány pohlavně pomocí semen. Generativní rozmnožování není v produkčním

vinohradnictví využíváno. Rostliny rozmnožované generativně nedědí znaky a vlastnosti rodičů. Klíčivost semen révy vinné je velmi nízká, to však není způsobeno jen genetickými vlastnostmi, ale i nepříznivými agroekologickými podmínkami, které mají vliv na vyzrállost semen. Révové keře získané generativním způsobem, mají variabilní morfologické a fyziologické vlastnosti. Generativně množená réva vinná plodí v pozdějších měsících, než vegetativně množená réva (Hronský a kol., 2000; Kraus, 2012).

3.2.1.2 Vegetativní rozmnožování (nepohlavní množení)

Vegetativní způsob rozmnožování je prováděn pomocí částí rostlin, což zabezpečuje přenos vlastností mateřské rostliny na nové potomstvo. Tento způsob množení je využíván ve vinohradnické výrobě při rozmnožování podnožových a ušlechtilých odrůd révy vinné. Výhodou vegetativního množení je tvorba bohaté kořenové soustavy, kompenzace negativních vlastností révy (např. slabý růst, sprchávání), pravidelná a kvalitní úroda, zvýšená odolnost vůči chloróze, fyziologickým poruchám a jiným škodlivým činitelům, také je zvýšena odolnost vrchní části révového keře vůči zimním mrazíkům (Gašpar a kol., 1996; Hronský a kol., 2000).

Vegetativní množení rozdělujeme dle způsobu získaných nových rostlin na:

A) Vegetativní rozmnožování přímé

Nově vzniklá rostlina je pouze z jedné části révového keře. Mladé rostliny ušlechtilé i podnožové révy, které jsou vysazené na produkční plochu, jsou nazývány kořenáče. Pro přímé rozmnožování lze využít různé způsoby: rozmnožování řízky jednoletého dřeva, rozmnožování pupenovými řízkami, rozmnožování zelenými rouby, rozmnožování hřížením a rozmnožování dolováním (Hronský a kol., 2000).

B) Vegetativní rozmnožování nepřímé

Po napadení révy mšičkou révokaz (*Viteus vitifoliae*) se začal využívat nepřímý způsob množení (roubování na rezistentní podnože), protože evropská réva hynula. Bylo zjištěno, že škůdce napadal kořenový systém a jedinou účinnou ochranou bylo štěpovat na odolné podnože, které vznikly křížením amerických druhů révy, nebo jako kříženci evropských odrůd s americkými druhy. Nově vzniklí štěpovance vznikali ze dvou velmi příbuzných druhů, které byly schopny odolávat mšičce pod prahem její

škodlivosti. Podnožové rouby vytváří kořenový kmen s postranními kořeny a ušlechtilá část tvaruje révový keř nad zemí (Hronský a kol., 2000; Pavloušek, 2011; Kraus, 2012).

Nejvíce používaným způsobem rozmnožování révy vinné je roubování. Je to spojení dvou botanicky příbuzných částí rostlin, které srůstem vytvoří jeden biologický celek schopný dalšího vývinu.

Kalus – ochranná vrstva hojícího pletiva, které je tvořeno na všech řezných ranách, kde srůstá podnož s ušlechtilou částí. Postupně je pletivo spojeno a srůstá v dělivé pletivo = kambium (do středu výhonu dřevo a směrem ven lýko) (Walter, 1997).

Hronský a kol., 2000 rozdělil roubování révy vinné podle termínu, místa a způsobu na:

Roubování za sucha také nazýváno, jako za stolem. Lze jej provádět po celou dobu vegetačního klidu. Z praktického hlediska vinohradníci rozdělují roubování za sucha dle doby provedení na zimní (leden, únor) a na jarní což je více využívaný termín (březen, duben). Podle způsobu provedení je roubování rozděleno na roubování v ruce (anglická jazýčková kopulace) a na roubování za pomoci strojku (při řezu strojkem vznikají různé tvary řezu - lamelový řez, omega řez, příčný řez)

Roubování na stanovišti za zelena je využíváno na přeroubování podnožových a nežádoucích odrůd, v době kvetení, nebo v době intenzivního růstu.

Roubování na stanovišti za sucha je vhodné pro přeroubování podnoží a nevhodných odrůd, které slabě rodí, opadávají jim květy (sprchávání), nebo z jiných biologických a agroekologických příčin. Vhodná doba roubování je těsně před rašením pupenů až do doby než vyraší první lístky. Nejčastěji lze roubovat na stanovišti za sucha třemi způsoby: roubování na kozí nožku, roubování do rozštěpu kořenového kmene, roubování do boku kořenového kmene (Hronský a kol., 2000; Pavloušek, 2011).

3.3 KULTIVACE RÉVY VINNÉ V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

3.3.1 Rostlinné explantáty

Rostlinné explantáty jsou samostatné rostlinné orgány, buňky nebo pletiva kultivované *in vitro* za velmi specifických, sterilních podmínek na živných půdách

(médiích). Rostlinná buňka má schopnost umožnit vznik různého pletiva, nebo i celého organismu (totipotence) a to je základem pro existenci rostlinných explantátů. Totipotetní buňky, jsou takové buňky, které mají schopnost utvořit jakýkoliv typ buňky, který se vyskytuje v organismu. Kompletní genetická informace je součástí každé totipotentní buňky, která má schopnost diferenciaci. U rostlinných druhů, které jsou pěstovány ve sterilních podmínkách, je eliminováno množství výskytu nežádoucích patogenů (bakterie, houby), (Bruce, 1998; Nátr, 1998).

Bauer v roce 1939 poprvé definoval explantát, jako každou část živého pletiva, komplex orgánů, nebo celý orgán, který je vytržen ze vzájemně propojených vztahů k celku a je pěstován v umělých podmínkách. Kontrolovaná aseptická kultivace explantátových rostlin, nebo jejich částí, je kultivace ve sterilních podmínkách na sterilních živných půdách (médiích) za přesně definovaných hormonálních (růstové regulátory), nutričních (nitráty, sacharidy) a fyzikálních (teplota, světlo, pH) podmínek (Kincl, Krpeš, 2000).

Rostlinným explantátem může být celá rostlina, listy, stonky, prýty, kořeny, pupeny, semena, meristémy, kalus, buňky, protoplasty, dokonce i embrya (Novák, 1990).

3.3.2 Techniky kultivace explantátu révy vinné v podmínkách *in vitro*

Metody rozmnožování v *in vitro* podmínkách, které jsou založeny na několika principech, jsou známy více než 20. let. Skoog a Miller, (1957) popsali vzájemný poměr auxinů a cytokininů tj. regulaci diferenciaci vrcholů a kořenů v podmínkách *in vitro* díky účinkům růstových regulátorů

Explantátové kultury z hlediska zachování genotypu rozlišujeme na kultury zachovávající původní genotyp a na kultury genotypově nestabilní. Kultury, které si zachovávají původní genotyp, jsou vhodné pro vegetativní množení v podmínkách *in vitro* (meristémové kultury, nodální a pupenové explantáty a embryokultury), naopak genotypově nestabilní kultury, u nichž hrozí výskyt mutací rozšiřující genetickou variabilitu využívanou ve šlechtění (suspensní a kalusové kultury, kultury protoplastů) (Nakano a kol., 1997; Šebánek a Sladký, 1988).

3.3.2.1 Kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*

Odborný termín *in vitro* je využíván v biologii, medicíně a dalších příbuzných oborech pracujících s živými organismy (mikroorganismy, buňky, biologické molekuly) a jejich částmi v uměle vytvořených podmínkách (mikroorganismy, nebo buňky jsou zkoumány na umělém kultivačním médiu, proteiny jsou pozorovány v roztocích). Z latiny je tento termín překládá jako „pod sklem“, kde lze něco kultivovat, pěstovat, nebo ozdravovat. *In vitro* lze také využívat při získávání nových genetických zdrojů nebo v experimentální biologii. Studie v *in vitro* podmínkách lze provádět ve zkumavkách, Petriho miskách, Erlenmayerových baňkách a dalším laboratorním skle (Novák, 1990).

Kultivace *in vitro* může být také využíván k rozmnožování rostlin vegetativním způsobem (klonování). Pletiva, která jsou izolována v aseptických podmínkách, jsou převáděny na živná média (půdy). Pokud mají tyto média vhodné složení, tvoří se na řezných ranách kalus neboli hojivé pletivo. Schopnost mikropropagace *in vitro* je u jednotlivých druhů rostlin různá a závisí nejen na genetické rozmanitosti, ale i na momentálním fyziologickém stavu variet a kultivarů (Muraschige, 1974; Nookaraju a kol., 2013).

3.3.2.2 Meristémové kultury

Meristémové kultury jsou zakládány z axilárních nebo vrcholových meristémů a umožňují získat viruprosté rostliny. Předností této metody mikropropagace je zachování genetické stability u získaného materiálu (Gifford a Hewitt, 1961; Galzy 1972; Bini, 1976; Šebánek a Sladký, 1988).

3.3.2.3 Kultura izolovaných orgánů

U užitkových a nekulturních dřevin může být kultura izolovaných orgánů vhodnou technikou kultivace izolovaných internodií s laterálními pupeny. Letorosty s pupeny jsou stratifikovány nebo jsou odebírány v období dormance. Rostliny vzniklé z pupenů si zachovávají genetickou stabilitu a jsou vhodné k využití k dalšímu rozmnožování v podmínkách *in vitro* (Torregrosa a kol., 1995).

3.3.2.4 Embryokultura

Embryokultura je využívána pro záchranu embryí z křížení mezi réвовými odrůdami, které vytváří málo semen, nebo z křížení mezi odrůdami tvořící málo semen a odrůdami, které tvoří dostatek semen (Stamp a Meredith, 1988, Bouquet, 1989; Tangolar a kol., 2008).

Embryokultura byla rozdělena dle Raghavan (1980) do dvou skupin:

- 1) Kultura semenných embryí, při této metodě je jako explantát využívána plně vyvinutá bipolární struktura obsahující stonkový a kořenový meristém.
- 2) Kultura embryí, za kterou jsou považovány všechna stádia nezralých zárodků, které předchází přerozdělování děloh.

3.3.2.5 Prašníková kultura

Při této metodě jsou ke kultivaci využívány celé prašníky sterilně vypreparované z poupat. Prašníky jsou vkládány na povrch pevného média (Bourgin a Nitsch, 1976), nebo plavou v tekutém médiu na povrchu (Wernicke a Kohlenbach, 1975). V průběhu 25 – 60 dnů začnou prorůstat zelené haploidní rostliny. Kultivace pomocí celých prašníků má nevýhodu v možnosti vzniku rostlin i ze somatických pletiv prašníku. Tento jev má za následek produkci rostlin různé ploidie (Sunderland a Roberts, 1979; Lopez Perez a kol., 2005; Cutanda a kol., 2008).

3.3.2.6 Kalusová metoda

Jako kalusová kultura může být využita různá část vegetativního orgánu. Explantáty mohou být části listů, řapíků, stonků, ale také i kořenů. Výsledkem přeměny buněk explantátů vzniká často kalus. V podmínkách *in vitro* představuje kalus heterogenní systém dediferencovaných i diferencovaných buněk, který nemá tvar, polaritu a organizovaný růst. Kalus lze pozorovat na okrajích explantátu, ve vztyčených místech v kontaktu s médiem (George a Sherrington, 1984).

3.3.3 Zásady multiplikace explantátů révy vinné v podmínkách *in vitro*

Jednotlivé genotypy révy vinné se vždy liší v tkáňové kultuře, a proto vyžadují optimální podmínky kultivace pro množení *in vitro*. Při manipulaci v laminárním boxu jsou explantáty velmi citlivé na dehydrataci. Proto práce musí být velmi rychlá a není vhodné brát více materiálu z kultivačních nádob. Jinak dochází vlivem sterilního proudu v laminárním boxu k rychlé dehydrataci. Optimální teplota v místnosti by měla být pro tento účel do 22°C. Dle Faltuse a kol. (2012) může být sníženo možné riziko poškození explantátů dehydratací, když umístíme segmenty do destilované vody. Abychom snížili nebo úplně eliminovali riziko poškození explantátů dehydratací, umístíme segmenty do sterilní destilované vody, která je připravena nejlépe v Petriho misce, kde dochází k úpravě segmentů (Nookaraju a kol., 2008; Faltus a kol., 2012).

3.3.4 Výhody využívání rostlinných *in vitro* kultur

Za jednu z hlavních výhod explantátových kultur lze považovat použití takových orgánů, nebo jejich částí, které nejsou ke klasickému vegetativnímu rozmnožování využívány. Výhody kultivace v *in vitro* podmínkách spočívají především ve vysoké rychlosti multiplikace a ve vysokém množitelenském koeficientu. Earle a Langhans, (1974) uvádí, jako příklad druh *Chrysanthemum morifilium*, jehož koeficient při klasickém množení (řízkováním) je 1:max. 3000, meristémovou cestou 1:10 milionům a cestou kalusové kultury 1:9 miliardám. Množení a produkce zdravého rostlinného materiálu, je jedním z největších přínosů rozmnožování ve sterilních podmínkách. Rostliny vyprodukované v *in vitro* podmínkách jsou uniformní, protože multiplikace probíhá vegetativně (produkce klonů), (Novák, 1990).

In vitro kultivace je využívána především k rozmnožování rostlinného materiálu, ale také při eliminaci patogenů, zejména virů. Kultivace se uplatňuje i při šlechtění nových odrůd, pro vědecké účely a při produkci látek (sekundárních metabolitů) využívaných ve farmacii, nebo průmyslu (Chaloupek, 1995; Razdan, 2003).

3.3.5 Nevýhody množení rostlin v podmínkách *in vitro*

Jednou z nevýhod multiplikace rostlin v podmínkách *in vitro* je možnost výskytu somaklonální variability, což je založeno na genetických změnách, které mohou

existovat již v primárním explantátu, nebo vzniknou během kultivace *in vitro*. U explantátů množených *in vitro* hrozí nebezpečí genetické degradace. Rostliny kultivované v *in vitro* podmínkách trpí velmi často hyperhydratací (vodnatění pletiv), (Dawn, 1987). Jako opatření proti hyperhydrataci Chee a Pool (1982) navrhl, že přidáním nízké koncentrace auxinů do média je tento jev minimalizován. Rostliny mohou také trpět habituací (schopnost některých explantátů po určitém čase obnovit biosyntézu chybějících látek (např. fytohormonů)). Další nevýhodou u rozmnožování rostlin v *in vitro* podmínkách je pracnost a energetická náročnost (Dawn, 1987; Razdan, 2003).

3.3.6 Rostliny využívané při kultivaci v podmínkách *in vitro*

Vhodné rostliny pro multiplikaci v podmínkách *in vitro* dle různých autorů:

Chaloupek, (1995) uvádí jako rostliny vhodné pro multiplikace, (klonování) např. brambor (*Solanum tuberosum*), réva vinná (*Vitis vinifera* L.), jahody (*Fragaria vesca*), lesní a ovocné dřeviny, orchidee (*Orchidea*), karafiáty (*Dianthus*). Broome a Zimmerman, (1978) zkoušeli multiplikovat ostružiník (*Rubus*), Hasegawa, (1978) růže (*Rosa*), Švábenská, (2011) uvádí, že v produkčním zahradnictví se tímto způsobem množí masožravé rostliny, africké fialky (*Saintpaulia*) a rododendrony (*Rhododendron*).

Muraschige, (1979) rozdělil proces rozmnožování rostlin v podmínkách *in vitro*, na jednotlivé kroky: založení aseptické kultury, multiplikace, příprava pro převedení rostlin do půdy a dopěstování rostlin v půdě.

3.3.7 Růstové regulátory

Růst rostlin byl koncem 19. století a na počátku 20. století spojován s procesy výživy. Myšlenku o existenci chemických látek vyslovil německý botanik Julius von Sachs, kdy za pomoci těchto látek mohou mezi sebou komunikovat jednotlivé orgány v rostlině. Sachs se domníval, že jedna látka podporuje růst listů a jiná způsobuje růst stonku, kořene, nebo květu. Doposud takové látky nebyly nikdy v rostlinách identifikovány (Razdan, 2003).

Koncem 20. století byl výzkum ohledně fyziologie růstu obrácen k tzv. růstovým látkám, poté označovaným jako rostlinné fytohormony (hormony). Dále k objevu

hormonů přispěla domněnka prof. R. Dostála, který použil experiment signálních (morfologických) přístupů. Jako příklad může být uveden růst klíčnicích rostlin hrachu, kdy po odřezání vrchní části lodyhy a jedné dělohy rostly pouze pupeny v úžlabí odříznuté dělohy. V dnešní době jsou tyto látky známé pod pojmem růstové regulátory (Švihra a kol., 1989; Procházka a kol. 1998).

Fytohormony hrají významnou roli při růstu a vývoji rostlin. Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem, a na druhé straně neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný růstový proces (Procházka a kol., 1997).

Silvestroni, (1981) uvádí, že druh kultivačního média závisí na druhu a kultivaru révy vinné, proto se výsledky v jedné studii velmi často liší s výsledky jiné studie. To by mohlo vysvětlovat rozdíly v minerálním složení a obsahu růstových regulátorů při zakládání primárních kultur a samotné multiplikaci

Regulátory rostlinného růstu bývají do kultivačních médií přidávány dle jejich účinku; stimulatory – podpora růstu, inhibitory – zpomalení růstu. Nejčastěji jsou využívány jako stimulatory cytokininy, auxiny, brassinosteroidy a gibbereliny. Kyselina abscisová slouží v kultivačních médiích, jako inhibitor rostlinného růstu. Zvláštním hormonem v kultivačních médiích je etylen, který je do nádobek na kultivaci produkován samotnou rostlinou (explantátem), (Fišerová, Hradilík, 1996; Hradilík, 2005).

3.3.8 Rozdělení růstových regulátorů

dle Procházky a kol. (1997)

1. regulátory růstu vznikající při metabolismu aminokyselin, mezi něž patří indolové a neindolové auxiny a fenolové látky tvořící se z aminokyselin tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu, etylen vznikající z metioninu.

2. regulátory růstu tvořené izoprenovými jednotkami vzniklými z kyseliny mevalonové, cytokininy, nebo abscisiny – jako kyselina abscisová a xanthoxin.

dle Kutiny (1988)

Autor rozděluje růstové hormony na stimulanty, mezi ně patří auxiny, gibbereliny a cytokininy. Další skupinou jsou inhibitory, které tvoří kyselina abscisová a etylen.

3.3.9 Nejčastěji využívané rostlinné hormony při multiplikaci *in vitro*

Základní složkou médií pro tkáňové kultury jsou auxiny a cytokininy. Kombinace těchto dvou hormonů v kultivačních médiích podporuje dediferenciaci a také opětovnou diferenciaci. Na základě výsledků mnoha studií bylo zjištěno, že vliv cytokininu na auxin v určitém procesu působí podpůrně nebo mírně modifikačně. Historie explantátových kultur ukázala, že přítomnost auxinu je nutná pro tvorbu kalusového pletiva v kultivačních médiích. Běžnou složkou kultivačních médií je dle Kurmiho, (2011) kyselina 2, 4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), která podporuje tvorbu kalusu i u takových druhů, nebo explantátů, u kterých jiné růstové regulátory působily neúčinně. Většina druhů vyžaduje pro indukci kalusu a pro dlouhodobější kultivaci kombinaci auxinu a cytokininu. Kombinace auxinů a cytokininů je využívána pro vyvolání organogeneze v kalusových a orgánových kulturách, občas se využívají i v prašníkových kulturách. Při zakořeňování *in vitro* a při indukci somatické embryogeneze mají zvláštní postavení (Novák, 1990; Procházka a kol., 1997; Procházka a kol., 1998).

Tabulka 1: Účinky nejčastěji využívaných rostlinných regulátorů v kultivačních médiích (Hradilík, 2005)

Růstový Hormon	Účinek
Auxiny	Indukce tvorby adventivních pupenů, stimulace kalusu a buněk, stimulace růstu apikálních meristémů, indukce somatické embryogeneze
Cytokininy	Snížení apikální dominance, podpora buněčného dělení, indukce aktivity meristému a tvorba pupenů, inhibice tvorby kořenového systému, podpora větvení (růst axilárních pupenů)
Giberiliny	Stimulace růstu kalusu, stimulace růstu buněčných kultur, stimulační růstu zakrslých rostlin, účinnost giberelinů v médiu je zapříčiněna přítomností auxinů v médiu
ABA	Stimulace kvetení, indukce somatických embryí, zbrzdění růstu explantátů, navození dormance

3.3.9.1 Auxiny

Auxiny jsou fytohormony, které mají za následek organogenezi a tvorbu rostlinných orgánů. Účinky auxinů v rostlinách jsou velmi rozmanité a četné. Udržují polaritu, ovlivňují větvení nadzemních a podzemních částí rostlin. Růstová aktivace je spjata se sníženou hladinou auxinu a se zvýšeným obsahem cytokininu v úzlabních pupenech. Stimulují pozitivně i negativně prodlužovací růst. Ve spojitosti s růstovou stimulací hrají auxiny roli v regulaci tropizmů (fototropismus, gravitotropismus). Auxiny nejen, že stimulují dělení buněk, ale i jejich prodlužovací růst, dále stimulují buněčné kambiální dělení a vývoj svazků cévních. Důležitou roli hrají auxiny při vývoji plodů. Dále auxiny regulují organogenezi *in vitro* a vůbec mají zásadní vliv při mezi orgánových komunikacích. Auxiny zpomalují zrání hroznů. V době vývoje bobule jejich obsah klesá, čímž dochází ke stimulaci zrání hroznů (Procházka a kol., 1997; Procházka a kol., 1998; Pavloušek 2011).

V kultivačních médiích jsou auxiny využívány, jako stimulatory růstu pro utváření kalusu a buněk, k indukci somatické embryogeneze, k utváření adventivních kořenů a ke stimulaci růstu apikálních pletiv. Auxiny vznikají v koleoptile (Procházka a kol., 1997).

Mezi přirozené auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), 4-chlor-IAA, kyselina fenyl-octová (PAA).

Syntetické auxiny rozděluje Procházka a kol. (1997) do pěti skupin:

- a) indolové kyseliny-kyselina indolyl-3-propionová (IPA)
- b) naftalenové kyseliny- α -naftyl-octová (NAA) a β -naftyl-octová (NOA)
- c) chlorfenoxykyseliny-2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T), 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová (MCPA)
- d) benzoové kyseliny-2,4,6 a 2,4,5-trichlorbenzoová, dicamba
- e) deriváty kyseliny pikolinové – picloram

3.3.9.2 Cytokininy

Cytokininy jsou hormony podporující buněčné dělení, indukují tvorbu pupenů a meristému. Tyto hormony podporují růst axilárních pupenů a snižují apikální dominanci a spolu s auxinem umožňují regeneraci rostlin v tkáňových kulturách. Přítomnost cytokininů v médiu velmi často brání tvorbě kořenů. Nejčastěji využívané cytokininy, které bývají přidávány do kultivačních médií jsou:

benzylaminopurin (BA),

6- γ - γ -dimethylaminopurin (2-ip),

N-1 (2-furfurylamin) 1-H-purin-6-amin (kinetin),

6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2 butanyl-amino) purin (zeatin) (Procházka a kol., 1998; Razdan, 2003) .

Přirozené cytokininy jsou zeatin a 2ip, mezi syntetické cytokininy patří BA a kinetin (Razdan, 2003)

Syntéza cytokininů probíhá hlavně v kořenech a to ve vrcholové části. Pomocí xylému jsou z vrcholové části transportovány do nadzemní části rostliny, především do listů. V listech přecházejí do floému a odtud mohou být rozváděny do jiných orgánů. Ve floému a xylému je transport cytokininů fotoperiodicky regulován a s polárním transportem IAA je velmi těsně propojen např. zvýšení koncentrace cytokininů v xylému, způsobila dekapitace fazolu, tuto koncentraci lze snížit na původní množství aplikací na dekapitovaný vrchol NAA. Opačně směřovaný transport cytokininů a transport IAA z vrcholu k bázi rostliny hraje významnou roli v regulaci morfogeneze (Procházka a kol., 1998).

Cytokininy stimulují větvení stonku a odnožování rostlin. Tento děj probíhá, když je potlačena dominance apikálního pupene. Ve většině případů se jedná o hlavní stonek. Cytokininy také zpomalují stárnutí rostlinných orgánů a pletiv. Stimulují diferenciaci tvorby chlorofylu, škrobu a plastidů. Zvyšují rezistenci rostlin vůči extrémním podmínkám (vysoká teplota, zaplavení kořenů a zasolení půdy). Iniciují tvorbu semene. Důležité je vědět, že cytokininy nezpůsobují tyto procesy samy, ale v souvislosti s jinými fytohormony (Procházka a kol., 1997; Procházka a kol., 1998).

V hormonálních regulacích různých fyziologických procesů hrají cytokininy velkou úlohu. Na řadu biologických procesů vykazují cytokininy shodné účinky, ale jen v případě, že je regulována pomocí genových manipulací jejich hladina. Biologickými procesy je myšleno stimulace buněčného dělení, stimulace větvení a tvorba odnoží, iniciace růstu adventivních pupenů, inhibice diferenciace, růst kořenů, redukce dlouhivého růstu a oddálení stárnutí pletiv. Cytokininy jsou schopny s jinými fytohormony (auxiny) působit na fyziologické procesy (Procházka a kol., 1997; Edwin a kol., 2008).

3.3.9.3 Gibereliny

Třetí významnou skupinu růstových regulátorů tvoří gibereliny. Gibereliny jsou méně často využívané rostlinnými explantáty, některé je vůbec pro svůj růst nevyžadují, avšak někdy je giberelin třeba přidat pro stimulaci růstu. Gibereliny stimulují růst zakrslých rostlin a tvorbu kalusu. Bez přítomnosti auxinu se účinky giberelinů málokdy projevují (Edwin a kol., 2008).

Chemicky patří gibereliny do skupiny terpenů. Celá skupina giberelinů je řazena do slabých organických kyselin. Jsou to bílé, krystalické látky, špatně se rozpouštějící ve vodě, jsou dobře rozpustné v alkalických vodných roztocích a organických rozpouštědlech. Není doporučováno je autoklávovat, což znamená, že se do sterilních médií přidávají přes bakteriální filtrace. Odlišnost jednotlivých giberelinů je v počtu hydroxylů a dvojných vazeb. Gibereliny si na rozdíl od aplikovaného auxinu v rostlině zachovávají po dlouhou dobu aktivitu a na růst nepůsobí toxicky, ani ve vyšší koncentraci. Jsou to nativní, stabilní látky vyrobené fermentací houby *Gibberella fujikuroi*. Gibereliny však mohou přecházet na neaktivní formy, tvorbou konjugátů se sacharidy (glykosidy, glukosyl estery). (Švihra kol., 1989) Pomocí organických rozpouštědel (80% metanol) je extrahujeme z rostlinného materiálu. V přítomnosti antioxidantů můžeme použít i octan etylnatý, etanol, nebo aceton, ale vždy v chladných podmínkách (Procházka a kol., 1997).

Podle struktury můžeme gibereliny rozdělit dvou skupin, gibereliny s 19 a 20 uhlíkovými atomy. (C-19 a C-20). Dle Procházky a kol. (1998) mohou gibereliny C-19 vznikat z derivátů C-20 vytvořením laktonového kruhu za odštěpení CO₂. Vznik giberelinů je pravděpodobně ve všech orgánech rostlin. V místech aktivního růstu a nově se tvořících orgánech byly zaznamenány nejvyšší hladiny giberelinů. Transport giberelinů probíhá floémem, ale byly zaznamenány i v xylému, což svědčí o jejich syntéze v kořenech (Procházka a kol., 1997; Procházka a kol., 1998; Edwin a kol., 2003).

Stejně jako u auxinů tak i giberelinů je známo, že stimulují růst. Rozdíl je však v tom, že gibereliny stimulují jen nadzemní části rostlin a neovlivňují kořeny. Součtem zvýšené elongace a zvýšeného dělení buněk je právě stimulace prodlužovacího růstu. Stimulují tvorbu hydroláz, protéz a ribonukleáz. U dlouhodobých rostlin indukují kvetení, ovlivňují pohlaví květů. U mnoha rostlin aplikace giberelinu zvyšuje tvorbu samčích květů (okurka, špenát), a tím pádem silně snižuje tvorbu květů samičích. Regulují klíčení, v embryu semene se nacházejí ve vázané formě. Stimulují: buněčné dělení, růst listů a plodů, růst postranních pupenů. Aplikace giberelinů zvyšuje nasazení plodů, ve většině případů je efektivnější než auxin. Tento účinek je nejefektivnější u jabloní a révy vinné (Procházka a kol., 1998; Rios-Iribe a kol., 2011).

Gibereliny jsou využívány při chemické ochraně proti hnilobám a *Botritis cinerea*, její výskyt plně neodstraňují, ale pouze částečně omezují, tím zvyšují zralost hroznů a jakost vín. Ve sladovnictví je giberelinů využíváno ke zvýšení sladu před fermentací kyseliny giberelové, která se podílí na aktivitě α -amylázy. Díky zvýšenému prodlužování internodií u cukrové třtiny zvyšují gibereliny obsah cukru a výnos. Ve šlechtění je kyselina giberelová využívána ke zkrácení juvenilní periody u jehličnanů a také někdy ke stimulaci vybíhání dvouletých rostlin nebo tvorby samčích květů. Gibereliny mohou působit i jako retardanty prodlužujícího růstu, tento proces je využíván u travníkových koberců a parkových porostů (Procházka a kol., 1997).

3.3.10 Méně využívané hormony z pohledu *in vitro* kultivace rostlin

3.3.10.1 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová je seskviterpen s 15 uhlíky, odvozena od kyseliny mevalonové. Kyselina abscisová se může vyskytovat v několika izomerických formách. Je to fytohormon, který signalizuje stres (Procházka a kol., 1998).

Kyselina abscisová je obsažena v rostlině ve velmi nízké koncentraci, její obsah kolísá v průběhu ontogeneze. Vodní stres, je hlavním faktorem, ovlivňujícím její hladinu. Syntetizuje se v dospělých listech, pupenech, semenech a hlízách. Pro biosyntézu ABA jsou velmi důležité karotenoidy, syntetizující se v chloroplastech dospělých listů. Kyselina abscisová je také utvářena v mladých špičkách kořenů a v menším množství u všech dalších orgánů (Procházka a kol., 1997).

Transport ABA je nepolární, svědčí o to první pokusy, které prováděl Dörffling a Böttger v roce (1968). V roce 1971 bylo jejich tvrzení potvrzeno Ingersollem a Smithem na pokusu s děložními segmenty bavlníku. V hrachovém epikotyly se později ukázalo, že transport může být ovlivnitelný jinými fytohormony (IAA). Transport ABA probíhá u rostlin v xylému, floému, někdy i v parenchymatických buňkách (Procházka a kol., 1997; Olinevich a Khokhlova; 2003).

Kyselina abscisová je inhibitorem prodlužovacího růstu, což znamená, že pro aplikaci ABA na rostlinná pletiva a orgány, dochází ke snížení rychlosti růstu, v tomto případě má ABA opačné účinky než gibereliny a auxiny. ABA také urychluje procesy stárnutí. Reguluje dormanci plodů, hlíz, cibulí a pupenů a tím brání předčasnému klíčení

nebo rašení. Nejdůležitější funkcí ABA je regulace vodního režimu rostlin. Zvyšuje také odolnost cytoplazmy vůči ztrátě vody při dlouhodobém suchu, zasolení, chladu či jinému poškození. Kyselina abscisová je velmi důležitým faktorem bránící rostliny proti stresům (Procházka a kol., 1998; Marcinska a kol., 2013).

3.3.10.2 Etylen

Etylen je fytohormon, který je produkován díky metabolismu rostlin. (Kutina, 1988) Pro praktický život je využití etylenu díky jeho vlastnostem nevhodný. Využívá se v kontrolované atmosféře při dozrávání ovoce. Etylen je také využíván ke zvýšení regenerace v mnoha *in vitro* systémech. Slouží jako retardant v obilnářství. Etylen se dokáže jako jediný regulátor rozkládat v pletivech rostlin na přirozené složky (fosforečnany a chloridy) (Procházka a kol., 1998).

3.4 RŮSTOVÉ REGULÁTORY A JEJICH KONCENTRACE VYUŽÍVANÉ PŘI MULTIPLIKACI *VITIS VINIFERA* L. V PODMÍNKÁCH *IN VITRO* DLE RŮZNÝCH AUTORŮ

Současná poptávka po *in vitro* množení rostlinách je stále vyšší, než produkce masově množeního rostlinného materiálu. *In vitro* namnožený materiál je vhodný také pro genetické výzkumy (Křížan a kol., 2012).

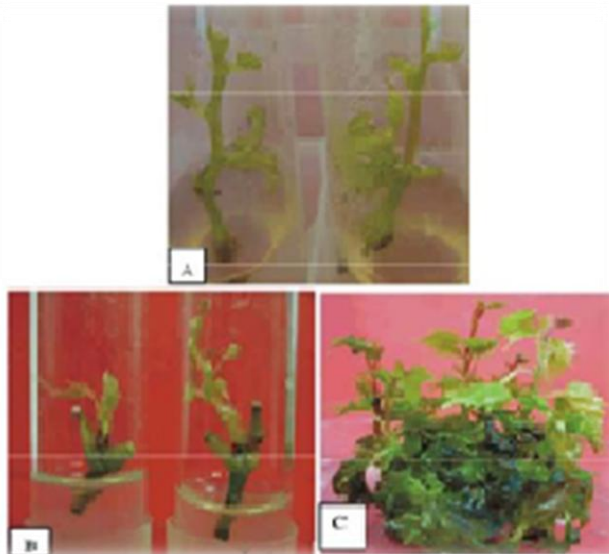
Při multiplikaci *Vitis vinifera* L. bývá živná půda (kultivační médium) označována směs anorganických solí (mikro a makro prvky) a organických sloučenin (převážně sacharidy), potřebných pro růst a vývoj rostlinných explantátů. Sacharidy slouží v kultivačních médiích, jako zdroj uhlíku a energie a agar, který zpevňuje růstové médium. Důležitou roli hrají v kultivačních médiích růstové regulátory. Média bývají dále doplněna také o vitamíny a aminokyseliny. Na složení kultivačního média každý genotyp révy vinné reaguje rozdílně (Bajaj a kol., 1986; Faltus, 2012).

Dev a kol, (2015) srovnávali multiplikaci různých révových genotypů v podmínkách *in vitro*. Práce byla prováděna na třech různých genotypech *Vitis vinifera* L. 'Pusa Navrang', 'Hybrid 76-1' (Hur x Cardinal), 'Pearl of Csaba'. Pro primární kultury bylo použito MS médium doplněné o BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), kinetin ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Pro multiplikaci bylo použito MS médium obsahující BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IBA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a AC (aktivní chlornan) ($200,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikace těchto hormonů vykazovala rychlé množení a iniciaci kultury. Množitelský koeficient byl v maximu zaznamenán u 'Pusa Navrang' (5,6), následovala 'Pearl Csaba' (5,1) a v minimu 'Hybrid 76-1' (4,9).

Křížan a kol, (2012) prováděli studii mikropropagace révových podnoží. Cílem bylo optimalizovat vhodné médium pro získání velkého množství rostlinného materiálu. Studie byla prováděna na podnožích révy vinné 'Kober 5BB', 'Kober 125 AA', 'Teleki 5C'. Nodální segmenty by kultivovány na MS, WPM, B5 a DKW. Fytohormony, které použil Křížan a kol., (2012): BA ($0,75; 1,0; 2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v kombinaci s NAA ($0,01; 0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), nebo IAA ($0,05; 0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). V této studii vykazovalo nejlepších výsledků DKW médium, kde byl koeficient množení nejvyšší. Použití BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) měl za následek průměrně ze všech podnoží 3,62 výhonků na explantát. Nicméně stejná

koncentrace BA s NAA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) napomohla k průměru 8,77 nových výhonků, což je výrazně vyšší než při použití samostatného BA nebo v kombinaci BA s IAA. U použití jiných koncentrací nebyl koeficient množení tak vysoký. Koncentrace BA ($1,0$; $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v kombinaci s IAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) vyvolávala u rostlin hyperhydricitu (vodnatění). Silná tvorba kalusu byla pozorována u rostlin, kde byla koncentrace BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) NAA.

Abido a kol. (2013) uvádí, že je réva vinná jednou z důležitých ovocných plodin, nejen však kvůli vinařskému průmyslu, ale i jako čerstvé nebo sušené ovoce. Studie, která byla provedena v roce 2013 v Egyptě, byla zaměřena na mikropropagaci révy vinné v podmínkách *in vitro* u odrůdy 'Muscat of Alexandria', což je bílá stolní odrůda. Byly odebírány vrcholové a internodiální segmenty (obr. 1A), které byly desinfikovány NaOCl (chlornan sodný). Po založení primárních kultur (obr. 1B) byly uniformní explantáty (2 – 3 cm velké) multiplikovány na MS médiu s BA ($1,0$; $2,0$; $3,0$; $4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,1$; $0,2$; $0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), (obr. 1C). Nejlepších výsledků bylo pozorováno u BA ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), multiplikační koeficient byl 3,2, délka nových explantátů byla průměrně 4,5 cm. Např. u kombinace BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byl množitelický koeficient 2,8 a délka výhonků 3,1 cm. Nejslabší účinky byly pozorovány pouze u NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) bez přidání BA, množitelický koeficient byl 1,1 a průměrná délka explantátů byla 0,9 cm.



Obr. 1 Mikropropagace *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro* dle (Abido a kol., 2013) A) révové explantáty při zakládání primární kultury, B) prorůstání úžlabních pupenů, C) multiplikace révy vinné

Autoři Alizadeh a kol. 2010 prováděli srovnávací studii mikropropagace na podnožích révy vinné v podmínkách *in vitro*. Jako rostlinný materiál použili konkrétně 'Dogridge' (*Vitis Champini*), 'SO4' (*V. riparia* x *V. berlandieri*), 'H-144' (*V. vinifera* x *V. labrusca*) a '3309 C' (*V. riparia* x *V. rupestris*). Pro zřízení primární kultury bylo využito 1,5 – 2 cm nodálních segmentů, obsahující jeden axilární pupen. Po povrchové desinfekci byly segmenty kultivovány na MS médiu doplněném o BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v kombinaci s nízkým obsahem NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Ze založené primární kultury byly odebírány dvou nodální segmenty, které byly vkládány na multiplikační MS médium obohacené o IBA ($2,0; 4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). pH bylo vždy upraveno na 5,8. Na multiplikačním médiu se nejlépe dařilo odrůdě 'H-144', průměrně tvořila 11-13 výhonků, odrůda 'Dogridge' tvořila 8-10 výhonků, odrůdy 'SO4' a '3309 C' měly počet nových výhonků stejný a to 6-8. Průměrný počet nových výhonků byl vyvozen z 8 subkultur.

Ve studii, kterou provedl v roce (2005) Ascensión a kol. byla sledovaná multiplikace révy vinné u odrůdy 'Napoleon'. Explantáty měly 2 – 3 pupeny a byly zkušeny na MS médiu bez hormonů, MS médiu obohacené o BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a C2D médiu v kombinaci s IBA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Všechna média obsahovala ($30,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) sacharózy a ($7,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) agaru, pH bylo upraveno na 5,8. Cílem práce byla produkce vysokého množství životaschopných explantátů. BA byl hlavním faktorem, který ovlivňoval

tvorbu více výhonků a životaschopnost. MS médium, kde nebylo přidáno žádných hormonů, produkovalo 38% explantátů. Na MS v kombinaci s BA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byl růst explantátů vyšší o 32 % než u MS média bez hormonů. C2D v kombinaci s IBA ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo zvoleno jako nejvhodnější médium v této studii.

Singh a kol. (2004) využívali ve své studii segmenty z polních výsadeb z odrůd 'Pusa Urvashi' a 'Pusa Navrang'. Segmenty pro založení primárních kultur byly 1,5–2 cm velké, po povrchové desinfekci byly segmenty kultivovány na MS médiu obohacené o kinetin ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Z práce je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo na MS médiu a IBA ($4,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), růstový koeficient byl uveden v procentech (80,6 %), průměrná délka výhonků byla 3,9 cm. V médiu pro primární kultury a i v médiu využívaném při multiplikaci bylo pH 5,8.

Polák a kol., (2009) využili pro studii „Ozdravování révy vinné od virů pomocí termoterapie a *in vitro* kultur“ na multiplikaci révy vinné segmenty z odrůd 'Modrý Portugal', 'Müller Thurgau'. Pro dané odrůdy bylo vybráno modifikované MS médium + sacharóza ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), agar ($6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), BA ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), MS/2 (s poloviční koncentrací mikroelementů než v médiu MS), C2D + IAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), WPM + mikroelementy WPM, mikroelementy, sloučeniny Fe a inositol jako MS, + BA ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), NAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Všechna použitá média kromě MS obsahovala sacharózu ($20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), agar ($6,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), pH bylo 5,8. Pro 'Modrý Portugal' nevyhovovalo ani jedno z uvedených médií. C2D médium obohacené o dané koncentrace hormonů vyhovovalo nejlépe pro 'Müller Thurgau'. Prorůstání axilárních pupenů nebylo dostatečně vyvoláno ani jedním z uvedených médií, proto je množitelský koeficient velmi nízký.

4 METODIKA

4.1 LABORATOŘ

Pokus byl prováděn na ústavu Mendeleum – ústav genetiky, ZF v Lednici v *in vitro* laboratoři. V této laboratoři je prováděno například množení certifikovaných podnoží ovocných dřevin *in vitro*, nebo ozdravování rostlin *in vitro*. Laboratoř je vybavena běžnými přístroji potřebnými pro explantátové kultury (autokláv, profimyčka, demineralizační soustava pro úpravu vody, laboratorní sklo, skladovací prostory, mraznička, chladnička, sušárna a také nástroje a laboratorní vybavení, jako např. pH metr, váhy, třepačka, stojany, elektronické míchadla s ohřevem, binokulární lupa, mikroskop a podobně). Prostor pro kultivaci rostlin *in vitro* (kultivační místnost), je vybaven regály pro kultivovaný materiál, zářivkami a spínacími hodinami (nastavení fotoperiody) a klimatizací.

Velmi důležitým vybavením laboratoře je speciální laminární box (flowbox) pro aseptickou manipulaci. Ve flowboxu je umístěn stojan pro skalpely a pinzety, sterilizační kostka nastavena na 250°C, sloužící pro sterilizaci nástrojů, nebo lihový kahan.

4.2 VÝBĚR A POPIS ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

K pokusu byl použit materiál z Technického izolátu ZF MENDELU v Lednici. Byly vybrány dvě odrůdy podnoží 'K5BB' a 'CR2 1/48' a dvě moštové odrůdy 'Modrý Portugal 20/52' a 'Müller Thurgau 25/7' révy vinné.

4.2.1 Odrůda 'Müller Thurgau' 25/7 = Ryzlink rýnský x Madlenka královská



Obr. 2 'Müller Thurgau' 25/7

'Müller Thurgau' 25/7 (dále jen MT) je bílá moštová odrůda, která je využívána na výrobu bílých vín (obr. 2). Raší středně a v mládí je charakteristická bujným růstem. Hrozny dozrávají od poloviny září. Listy jsou velké neurčitě zvlněné s okrouhlým tvarem čepele a hlubokými výkroji, z vrchní strany tmavě zelené barvy s malými puchýřky a ze spodní strany jsou lehce ochmýřené. Květy jsou oboupohlavné pětičetné, samosprašné. Plodem jsou malé až středně velké eliptické bobule žlutozeleně zbarvené. Dužnina obsahuje 2 až 3 hruškovitá středně velká semena. Hrozen má středně velký, kuželovitý tvar obsahující křídélka. (Sotolář, 2006)

4.2.2 Odrůda 'Modrý Portugal' 20/52



Obr. 3 'Modrý Portugal' 20/52

Odrůda 'Modrý Portugal' 20/52 (dále jen MP) je modrá moštová odrůda využívaná na výrobu červených vín (obr. 3). Původ této odrůdy je neznámý. Hrozny dozrávají koncem září až začátkem října. Listy jsou středně velké až velké s tři až pěti laloky, horní boční výkroje jsou mělké. Horní strana čepele je světle zelená, až zelená s lehkými puchýřky spodní strana je zcela hladká. Květy jsou samosprašné, oboupohlavné, pětičetné. Kulatá bobule je středně velká, voskovitě oviněná, barvy tvamodré až tmavočerné. Semena uvnitř nezbarvené dužniny jsou hruškovitá. Středně hustý hrozen má kuželovitý tvar s jedním až dvěma křídélky. (Galet, 2000; Kraus a kol., 2005)

4.2.3 Podnož 'Kober 5BB' = *Vitis Berlandieri* x *Vitis Riparia*



Obr. 4 'Kober 5BB'

'Kober 5BB', nebo li zkráceně 'K 5BB' je odrůda révy vinné, která byla speciálně vyšlechtěna, jako podnož (obr. 4). Poslední selekce této podnože byla provedena v Rakousku ve městě Klosterneuburg roku 1904.

'Kober 5BB' je dvoudomá podnožová odrůda. Listy jsou v mládí nečleněné, zelené s bronzovým nádechem. Starší listy jsou tmavozelené, střední až velké, okrouhlé až středně protáhlé do délky. Květenství je řídké, gynoidní (jednopohlavní). Květy jsou pětičetné v žlutozelených hroznovitých květenstvích. Válcovitě kuželovitý hrozen je malý, volný s malými, kulatými modře až černě zbarvenými bobulemi. (Šimek, 2008; Ambrosi, 2010; Sotolář 2006)

4.2.4 Podnož 'Crâciunel 2' 1/48 = Vitis berlandieri x Vitis riparia

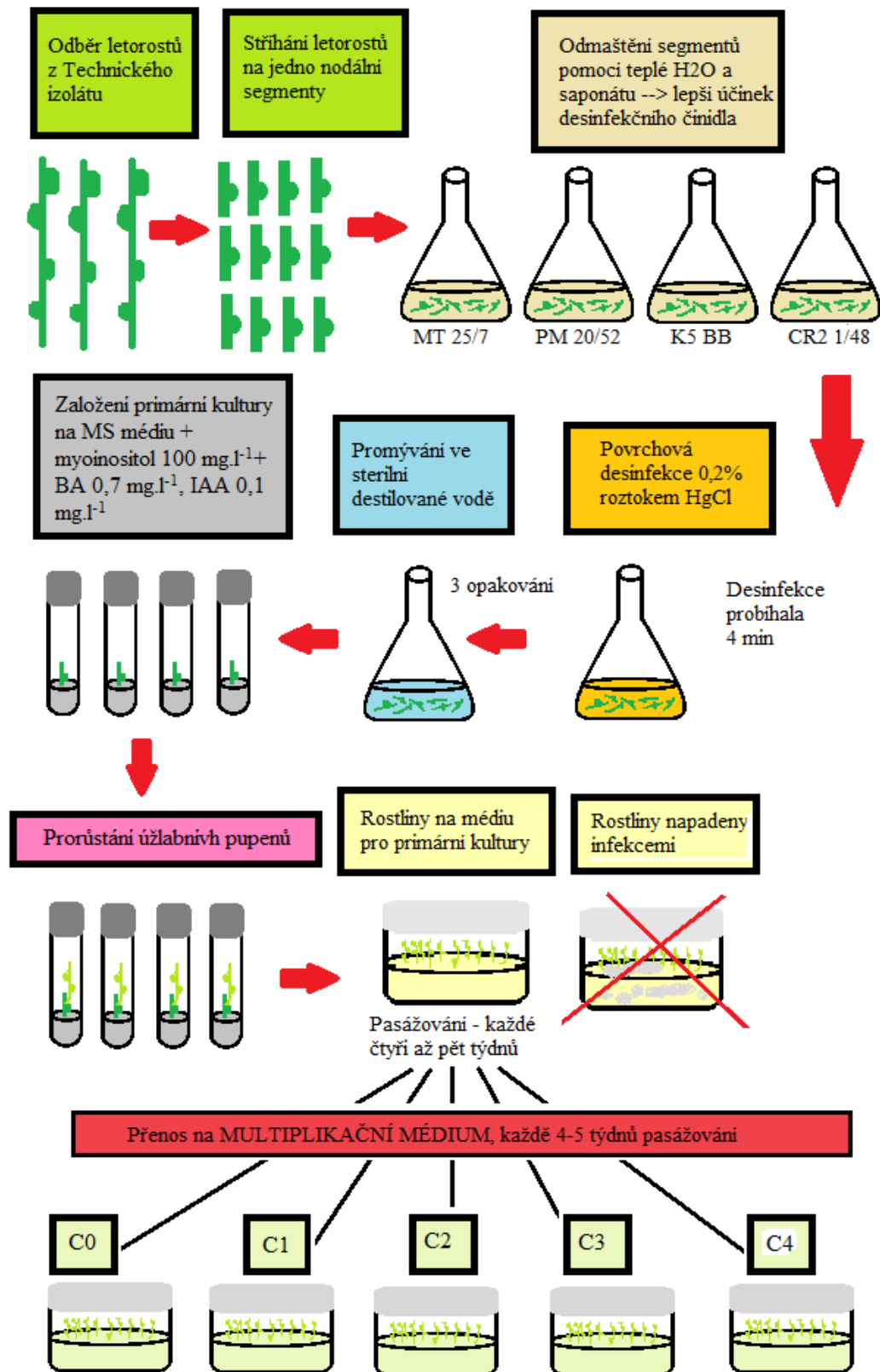


Obr. 5 'CR 2' 1/48

'Crâciunel 2' 1/48 zkráceně 'CR 2' je odrůda révy vinné, která byla vyšlechtěna, jako podnožová odrůda (obr. 5). Šlechtění proběhlo v Rumunsko v roce 1935 selekcí podnože K 5BB.

Tato podnožová odrůda révy vinné je dvoudomá, pnoucí, dřevitá liána se zploštělými letorosty, které jsou ve stáří ohýbány. Mladé listy jsou protáhlé, třílaločné, zbarvené do vínově červené, později se barva mění na zelenou s hnědým odstínem. List je v dospělosti středně velký až velký, nečleněný nebo s tři až pěti laloky. Čepel listu je tmavozelená z obou stran jemně plstnatá. Řídké květenství s jednopohlavními pětičetnými květy hroznovitého tvaru je žlutozelené barvy. Hrozen je válcovitě kuželovitý, velmi volný s malými, modročernými kulatými bobulemi. (Šimek, 2008; Sotolář 2006).

4.3 SCHÉMA PŘÍPRAVY ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A PŘEVOD DO ASEPTICKÝCH PODMÍNEK



Obr. 6 Schéma pokusu

4.4 PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A PŘEVOD DO ASEPTICKÝCH PODMÍNEK

Mladé letorosty révy vinné, byly odebrány 19. května 2015 z Technického izolátu. Jednotlivé letorosty byly nastříhány na jednodální segmenty. Tyto segmenty byly vloženy do teplé vody se smáčedlem (saponát), kde došlo k jejich odmaštění, pro lepší účinek desinfekčního činidla. Ostatní činnosti již probíhaly ve sterilním prostředí (flowboxu). Voda se saponátem byla slita a následovala povrchová desinfekce. Za desinfekční činidlo byl zvolen 0,2% chlorid rtuťnatý, který byl nalit do Erlenmayerovy baňky do takové hladiny, aby byly všechny segmenty ponořeny (obr. 7). Při tomto kroku bylo nutné dbát vysoké bezpečnosti a pracovat s ochrannými rukavicemi, protože byla použita zdraví nebezpečná látka. Desinfekce probíhala u každé odrůdy 4 minuty. Po uplynutí doby působení byly segmenty 3 krát promývány sterilizovanou destilovanou vodou. Po povrchové desinfekci byly nodální segmenty zakráčeny, aby se eliminovalo riziko zbytku chloridu rtuťnatého v živém pletivu. Takto připravené segmenty byly přeneseny na médium sloužící pro založení primární kultury.



Obr. 7 Erlenmayerovy baňky s chloridem rtuťnatým a nodálními segmenty révy vinné

4.5 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

Pro pokus bylo využito šest druhů médií:

MS médium – Murashige, Skoog (1962), médium pro primární kultury

Multiplikační média:

DKW/Juglans médium (1984), (pracovní označení C0), toto médium bylo již v laboratoři využíváno a bude tedy sloužit, jako kontrolní,

MS médium – Murashige, Skoog (1962), (pracovní označení C1),

C2D médium – Chée and Pool (1987), (pracovní označení C2),

MS médium – Murashige, Skoog (1962), pracovní označení C3),

QL médium – Quoirin a Lepoivre (1987), (pracovní označení C4).

Pro uvaření 1 litru média, bylo nejdříve nutné rozvařit agar (vždy 6000 mg) ve 200 ml destilované vody v jednotlivé Erlenmayerově nádobě na elektromagnetickém míchadle s ohřevem. Po rozpuštění agaru byla do nádoby přidána v destilované vodě (přibližně 200 ml) předem rozpuštěná směs sacharózy (vždy 30 000 mg), různých typů komerčně dodaných médií (kromě média C2D, které bylo připraveno v laboratoři) a rozličné koncentrace rostlinných hormonů. Komerčně připravené směsi médií byly ve všech případech dodány firmou Duchefa (Nizozemsko). Nakonec bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu, a to buď 5% NaOH nebo 1 M HCl.

4.5.1 Příprava média pro primární kultury

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou, myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátory rostlinného růstu BA (0,7 mg·l⁻¹), IAA (0,1 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

4.5.2 Příprava C0 média

V destilované vodě bylo rozpuštěno 5584,5 mg·l⁻¹ komerčního DKW média, spolu se sacharózou, myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátory rostlinného růstu BA (0,6 mg·l⁻¹), IBA (0,01 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 6.

4.5.3 Příprava C1 média

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg·l⁻¹ komerčního MS média, spolu se sacharózou, myoinositolem (100 mg·l⁻¹) a regulátory rostlinného růstu BA (3,0 mg·l⁻¹), NAA (0,2 mg·l⁻¹). Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

4.5.4 Příprava C2 média

V destilované vodě byl na elektromagnetickém míchadle s ohřevem rozpuštěn agar, postupně byly přidávány mikroelementy, makroelementy, vitamíny, sacharóza a růstové hormony (BA 1,5 mg·l⁻¹). Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,6.

Mikroelementy v mg·l⁻¹

CoCl₂·6H₂O – 0,025

CuSO₄·5H₂O – 0,05

FeNaEDTA – 36,70

H₃BO₃ – 6,20

MnSO₄·H₂O – 0,85

Na₂MoO₄·2H₂O – 0,25

ZnSO₄·7H₂O – 8,60

Makroelementy v mg·l⁻¹

Ca(NO₃)₂ – 492,30

KH₂PO₄ – 170,00

KNO₃ – 1900,00

MgSO₄ – 180,54

NH₄NO₃ – 1650,00

Vitamíny v mg.l⁻¹

Myoinositol – 10,00

Kyselina nikotinová – 1,00

Pyridoxin HCl – 1,00

Thiamin HCl – 1,00

4.5.5 Příprava C3 média

V destilované vodě bylo rozpuštěno 4405,19 mg komerčně vyrobeného MS média, spolu se sacharózou, myoinositolem ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a regulátory rostlinného růstu BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IBA $1,0 \text{ (mg}\cdot\text{l}^{-1})$. Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 5,8.

4.5.6 Příprava C4 média

V destilované vodě bylo rozpuštěno xx komerčního Quoirin a Lepoivre média, spolu se sacharózou, myoinositolu ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), regulátorů rostlinného růstu BA ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), NAA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), KNO₃ ($300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), mikroprvků z MS média. Tato směs byla přidána k rozvařenému agaru a do jednoho litru doplněna destilovanou vodou. Konečné pH bylo upraveno na 6,4.

Médium pro primární kultury bylo naplněno do velkých zkumavek v množství 10 ml na zkumavku a uzavřeno alobalovým víčkem. Takto naplněné zkumavky byly 20 minut autoklávovány. Po vyjmutí z autoklávu byly zkumavky zchlazeny na pokojovou teplotu.

Média připravená pro multiplikaci byla rozlévána automatickým dávkovačem do skleněných kultivačních nádob v množství 100 ml. Nádoby byly uzavřeny šroubovacím víčkem a 20 minut autoklávovány. Po vyjmutí z autoklávu byly nádoby zchlazeny na pokojovou teplotu.

V případě prvotního (slabého) výskytu bakteriální infekcí během kultivace révy, bylo při následné přípravě daného média přidáno širokospektrální antibiotikum ProClin

(Sigma Aldrich, USA) v množství $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Explantáty byly na médium s antibiotikem kultivovány čtyři týdny. Následně probíhala kultivace opět na médiu bez antibiotik

4.6 ZALOŽENÍ POKUSU

Připravené a desinfikované segmenty (‘MT’ – 26 kusů, ‘PM’ – 20 kusů, ‘K 5BB’ – 21 kusů, ‘CR2’ – 24 kusů) byly pinzetou přenášeny do velkých zkumavek, ve kterých bylo médium pro primární kultury. Každý segment byl z jedné třetiny vtlačen do média (obr. 8). Takto připravené vzorky byly kultivovány při teplotě $22 \pm 1^\circ\text{C}$ fotoperiodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma. K osvětlení byly použity zářivkové trubice s intenzitou $20, 25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 8 Jednonodální segmenty připravené ke kultivaci

4.7 PRŮBĚH POKUSU

V průběhu kultivace byly vyřazovány segmenty napadené infekcí. Po 14 dnech bylo pozorováno prorůstání prvních úžlabních pupenů. Prorostlé úžlabní pupeny byly pasážovány na čerstvé médium. Pasážování probíhalo každé tři týdny, aby bylo předcházeno hyperhydrataci rostlin a explantáty měly neustálý přísun živin. Dalším důvodem pasážování jsou odpadní látky, které explantáty během kultivace vylučují, a které mohou brzdit jejich následný růst a vitalitu.

Primární kultura

Na médiu pro primární kultury byly jednonodální segmenty kultivovány 3 týdny. Po 3 týdnech byly z každé odrůdy ('MT' 25/7, 'PM' 20/52, 'K5 BB', 'CR2' 1/48) odebírány první prorostlé úžlabní pupeny, které byly pasážovány na čerstvé médium (obr. 9). Počet prorůstajících pupenů je uveden v tab. 2. Po prvním převodu byl počet jednotlivých prorostlých pupenů velmi podobný. V jednotlivém pasážování byly vyřazovány rostliny napadené infekcí. V průběhu druhého kultivačního období došlo k odumírání segmentů u odrůdy 'PM', 'MT', 'K5 BB', díky tomu klesl počet jednotlivých segmentů o polovinu. Po třetím pasážování bylo jasně patrné, že nejlépe vyhovující rostlinný materiál pro multiplikaci je odrůda 'CR2' 1/48 s nejvyšším počtem prorostlých pupenů. Segmenty, které zůstaly po třetím pasážování u odrůd 'PM', 'MT' a 'K5 BB' (počty jsou uvedeny v tab. 2) byly dále zkoušeny na primárním médiu, postupem času docházelo k jejich nekrotizování, a odumírání. Proto tyto odrůdy byly zvoleny, jako nevhovující rostlinný materiál k další práci.

Tabulka 2: Úspěšnost převodu rostlin do aseptických podmínek (počet rostlin v ks)

Primární kultury				
Odrůda	založení kultury	1. pasážování	2. pasážování	3. pasážování
'MT' 25/7	26	24	13	9
'PM' 20/52	20	16	7	3
CR 2' 1/48	24	21	51	75
'K 5BB'	21	19	8	1



Obr. 9 Prorostlé úžlabní pupeny u odrůd 'MP' 20/52, 'MT' 25/7, 'CR2' 1/48, 'K5 BB'

Počáteční stav prorostlých úžlabních pupenů z odrůdy 'CR 2' byl u každého média 15 kusů. Tyto pupeny byly rozděleny tak, aby vzniklo pět kultivačních nádob po třech explantátech.

5 VÝSLEDKY

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel a Statistika 12, parametrickou analýzu variace vícefaktorové ANOVY, post hoc Tukey HSD testem, na hladině průkaznosti $p > 0,05$.

Při vyhodnocování výsledků bylo sledováno:

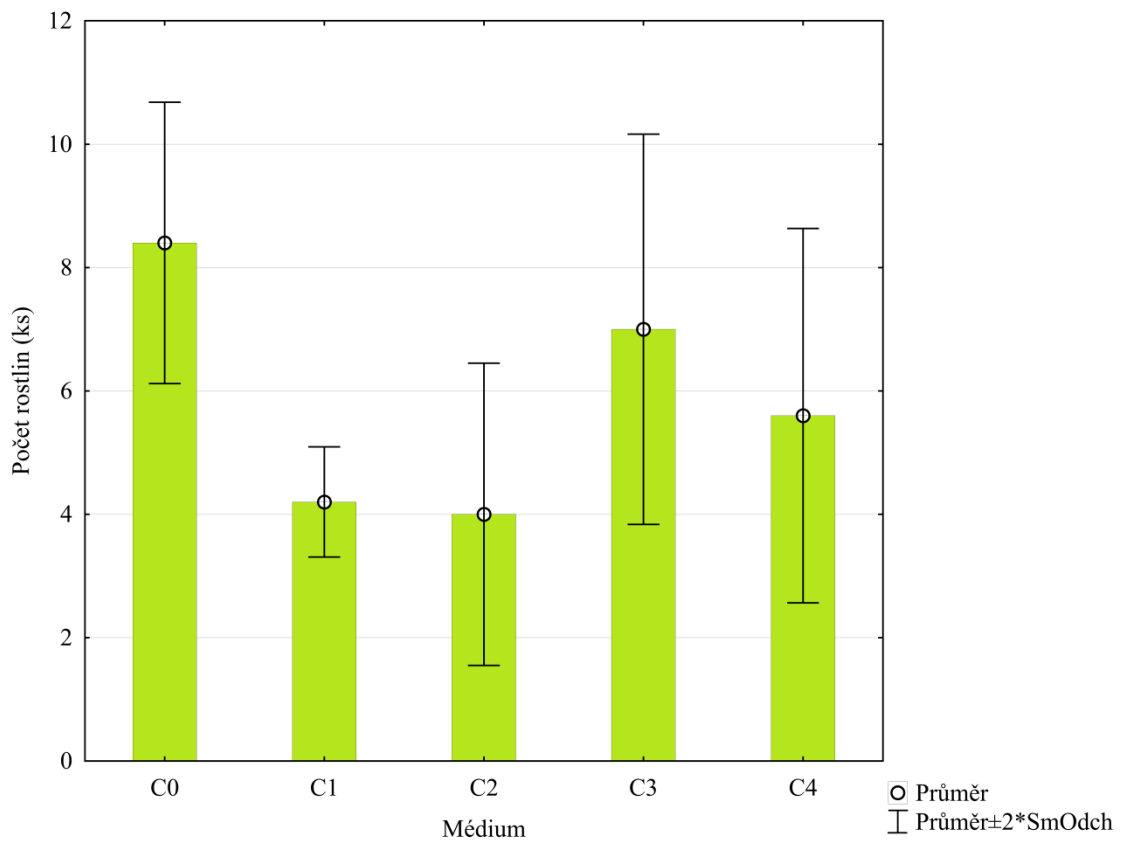
- 1) Multiplikace explantátů na vybraných médiích během jednotlivých pasážování
- 2) Multiplikační koeficient révy vinné na vybraných médiích s obsahem různých kombinací rostlinných regulátorů.

5.1 MULTIPLIKACE EXPLANTÁTŮ NA VYBRANÝCH MÉDIÍCH V JEDNOTLIVÉM PASÁŽOVÁNÍ

Graf 1. – 4. Znáznorňuje průměrný počet vzniklých rostlin v jednotlivých pasážování na zvolených médiích. Vyhodnocení probíhalo parametrickou analýzou variace ANOVA, post hoc Tukey HSD testem, na úrovni $p 0,05$.

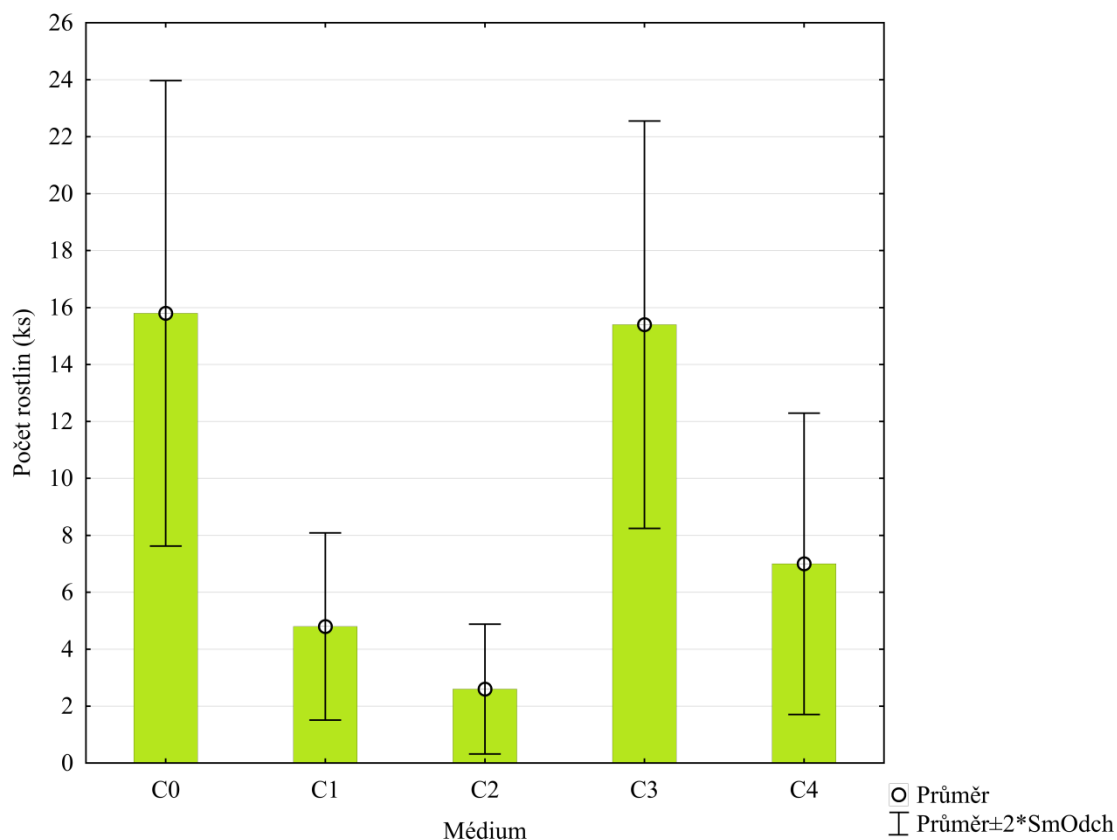
Graf 5. znázorňuje celkový počet vzniklých rostlin (počet je uveden v kusech) ve 4 pasážováních.

Graf 6. znázorňuje srovnání celkového počtu rostlin (počet je uveden v kusech) ve všech pasážováních.



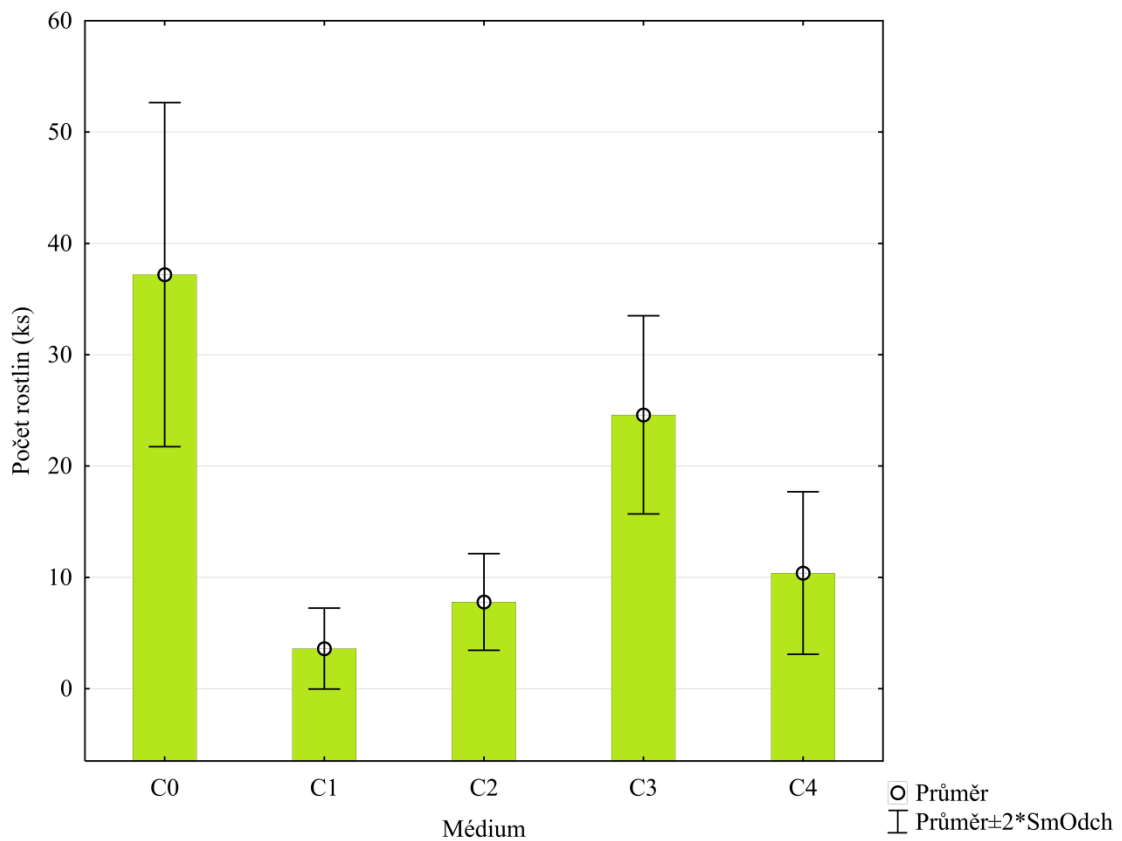
Graf 1: Průměrný počet vzniklých rostlin na jednotlivých médiích po 1. pasážování.

Jak je patrné z grafu 1, při prvním pasážování bylo C0 médium pro multiplikaci nejvhodnější. Statisticky průkazně lepší bylo, ale toto médium pouze ve srovnání s C1 médiem. Multiplikace na C3 médiu byla statisticky průkazně vyšší než u média C1, C2 a C4.



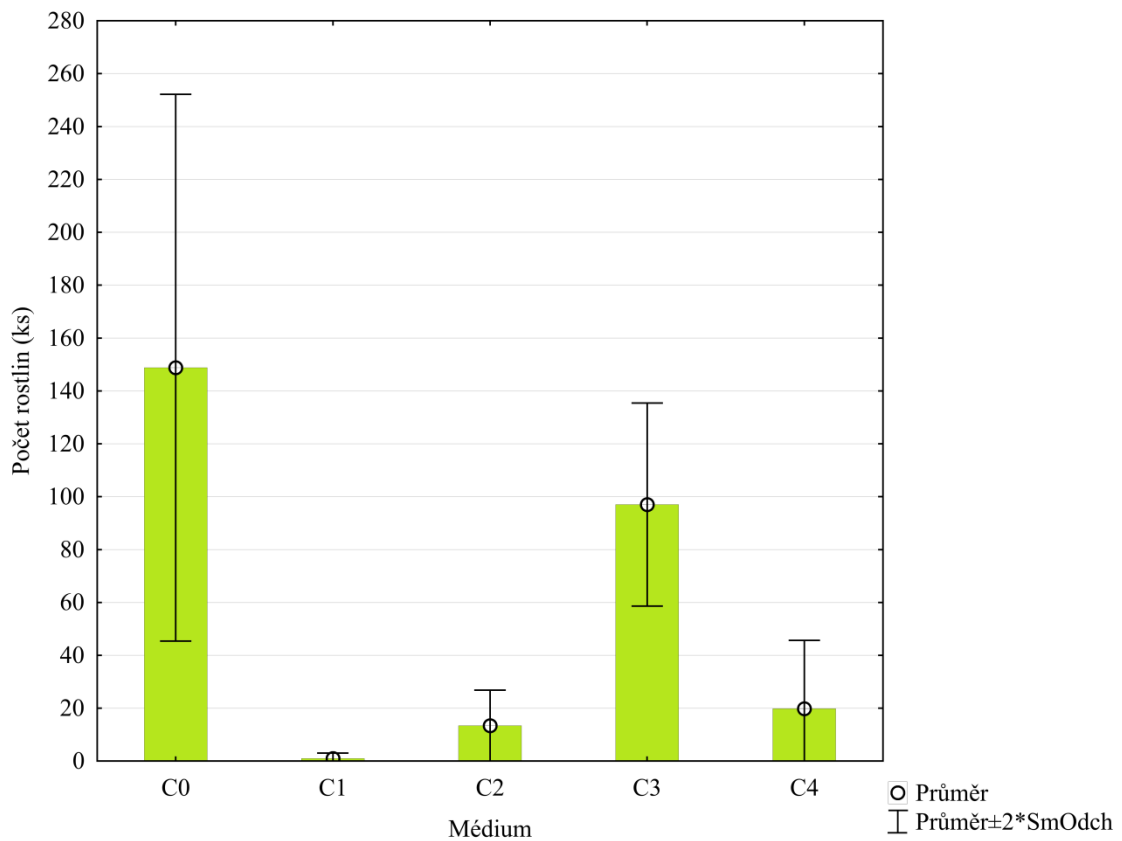
Graf 2: Průměrný počet rostlin vzniklých na jednotlivých médiích po 2. pasážování.

Z grafu. 2 vyplývá, že C0 a C3 médium byly pro multiplikaci révy vinné statisticky prokazatelně lepší než C1, C2 a C4 médium. Na C2 médiu byla v 2. pasážování multiplikace statisticky nejnižší. C4 médium bylo statisticky lepší než C1 a C2 médium.



Graf 3: Průměrný počet vzniklých rostlin na jednotlivých médiích po 3. pasážování.

Z grafu. 3 je patrné, že během multiplikace na C0 médiu vznikl statisticky nejvyšší počet výhonů během 3. pasážování. C0 médium je statisticky průkazně lepší než C1, C2 a C3 médiem. C3 médium bylo pro multiplikaci statisticky prokazatelně lepší než C1 a C2 médium.

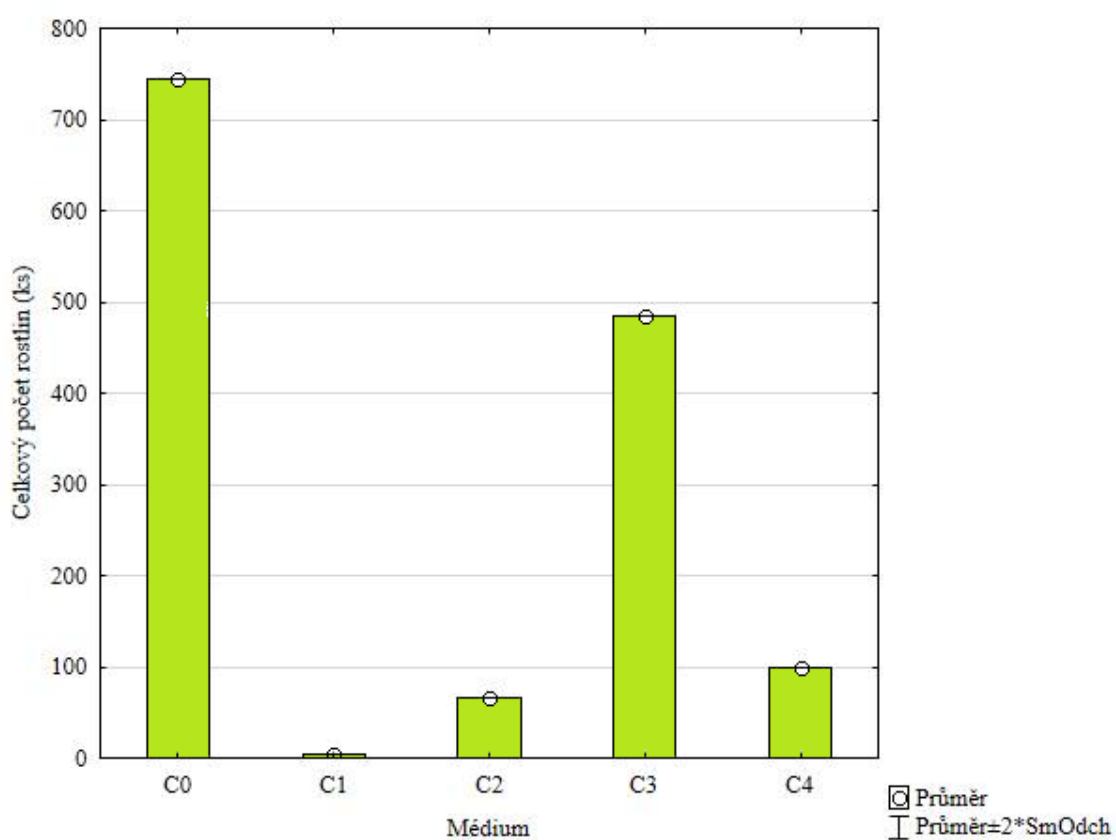


Graf 4: Průměrný počet vzniklých rostlin po 4. pasážování na jednotlivých médiích.

Z grafu. 4 je patrné, že multiplikace rostlin na C0 médium byla statisticky průkazně vyšší než na ostatních médiích. Ve čtvrtém pasážování byl na C0 médiu pozorován během multiplikace nejvyšší počet nově vzniklých výhonů. Multiplikace explantátů na médiu C1 byla statisticky nejhorší. C2 médium bylo statisticky horší pro multiplikaci než C0 a C3 médium. Jak je z grafu patrné na C3 médiu bylo vytvořeno statisticky méně nových výhonů než na C0 médium.

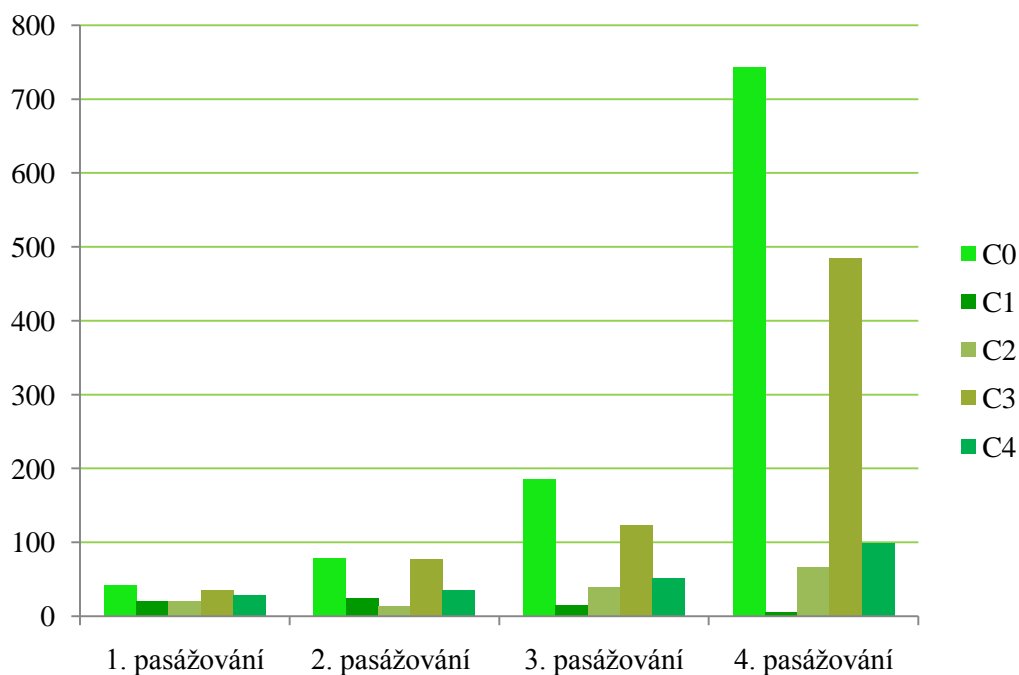
Tabulka 3: Celkový počet rostlin na počátku multiplikace a v průběhu jednotlivých pasážování.

Médium	počátek	1. pasážování	2. pasážování	3. pasážování	4. pasážování
C0	15	42	79	186	744
C1	15	21	24	15	5
C2	15	20	13	39	67
C3	15	35	77	123	485
C4	15	28	35	52	99



Graf 5: Celkový počet rostlin (ks) po 4. pasážování.

Z grafu. 5 je patrné, že nejvíce nových rostlin po 4. pasážování vzniklo na C0 médiu. Na C1 médiu vzniklo při multiplikaci ve 4. pasážování nejméně nových rostlin. Na C2 médiu po 4. pasážování nevzniklo ani 100 ks nových rostlin. Na C3 médium byla multiplikace po C1 média druhá nejvyšší.



Graf 6: Srovnání počtu nově vzniklých rostlin při multiplikaci v jednotlivých pasážováních

Z grafu. 6 je jasně patrný největší nárůst nových rostlin ve 4. pasážování. Počet rostlin na C0 médiu byl při posledním pasážování, oproti ostatním médiím, více než trojnásobný (744 ks). Multiplikace na tomto médiu byla v porovnání s ostatními médii nejvyšší. Naopak v porovnání s ostatními médii nejhorších výsledků vykazovalo C1 médium (5 ks). Multiplikace na tomto médiu v podstatě neprobíhala, nastal významný pokles a úhyn rostlin, jak je již patrné z předešlých grafů. Přesné počty nově vzniklých rostlin v jednotlivých pasážováních jsou uvedeny v tab. 3

5.2 HODNOCENÍ EXPLANTÁTŮ NA JEDNOTLIVÝCH MÉDIÍCH A VYJÁDŘENÍ MULTIPLIKAČNÍHO KOEFICIENTU

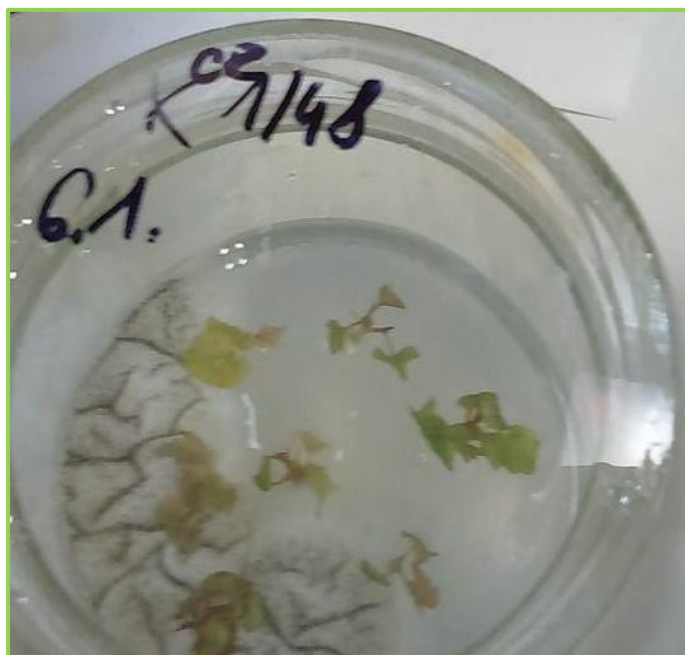
Vyhodnocení rostlin je vyjádřeno u každého média samostatně. Multiplikační koeficient byl vypočítán z tab. 3, jako průměr celkového počtu vzniklých rostlin ve 4. pasážování ku počátečnímu počtu explantátů (vždy 15 kusů).

5.2.1 Médium C0

Médium C0 vykazovalo od začátku výrazně vyšší počet nově vznikajících rostlin. Na počátku kultivace na multiplikačním médiu C0 bylo 15 rostlin, které se postupem 4 pasážování (každé 4 týdny) viditelně množily. Díky vhodně zvolené koncentraci BA bylo podpořeno buněčné dělení a tvorba nových pupenů. Kombinace BA a IBA v tomto případě pozitivně ovlivňovala regeneraci rostlin v médiu. Rostliny byly vitální a nebylo pozorováno žádné poškození (obr. 10), jako je např. vitifikace, hnědnutí explantátů, nebo vadnutí. Mikrobiální infekce byly pozorovány zřídka a pouze ze začátku kultivace. Takto napadené rostliny byly ihned vyřazeny (obr. 11). Každé pasážování vykazovalo velmi pozitivní výsledky, rostliny byly množeny velmi dobře a byly jasně viditelné nově vyrostlé výhonky. Celkový počet rostlin (ks) v jednotlivém pasážování je uveden v tab. 3. Množitelkový koeficient byl 1:49,6, průměrný nárůst na jeden explantát ve 4. pasážování byl 4,0 výhonů.



Obr. 10 Rostliny na C0 médiu během multiplikace



Obr. 11 Rostliny na C0 médiu při napadení infekcí

5.2.2 Médium C1

Médium C1 bylo obohaceno nejvyšší dávkou BA ze všech médií. Na toto médium bylo přeneseno 15 explantátů. V první dekádě pasážování explantáty vytvářely malou kalusovou vrstvu z níž vyrůstaly nové prýty. Na explantátech byly pozorovány hnědé skvrny na listech, rostliny postupně nekrotizovaly a následně odumíraly (obr. 12). Po čtvrtém pasážování byly odřezány ze segmentů nekrotické listy a odstraněny zaschlé výhonky, rostliny byly velmi zakrslé. Multiplikace na tomto médiu vůbec neprobíhala. Rostliny trpěly vitifikací a následně odumíraly. Po vyhodnocení zůstalo 5 rostlin, což odpovídá koeficientu množení 1:0,33, bylo jasně patrné, že vysoká dávka BA v kombinaci s NAA není vhodná pro multiplikaci. Celkový počet vzniklých rostlin (ks) v jednotlivém pasážování je uveden v tab. 3. Průměrný nárůst na jeden explantát byl ve 4. pasážování 0,33 výhonů.



Obr. 12 Rostliny na C1 médiu během multiplikace

5.2.3 Médium C2

Na C2 médium bylo přeneseno 15 explantátů. Byla zde použita poloviční dávka BA než na C1 médiu. Rostliny se od začátku rozmnožovaly velmi pomalu, docházelo ke žloutnutí explantátů. Explantáty trpěly hyperhydratací (vodnatění pletiv), (obr. 13). Explantáty byly velmi malé, žloutnoucí listy se stáčely směrem dolů a okraje listů byly nekrotické. Médium bylo velmi často napadáno bakteriálními infekcemi, proto byly rostliny přeneseny na médium C2 s antibiotiky. Po vyléčení byly opět kultivovány na médiu C2 bez antibiotik. Po čtyřech měsících kultivace byl množitelský koeficient 1:4,46 a průměrný nárůst na jeden explantát byl ve 4. pasážování 1,71 výhonků. Počet rostlin (ks) v jednotlivém pasážování je uveden v tab. 3.



Obr. 13 Explantáty během multiplikace na C2 médiu

5.2.4 Médium C3

C3 médiu obsahovalo stejnou koncentraci BA, jako C2 médiu, tato koncentrace byla ještě doplněna o IBA. Explantáty vytvářely velké množství kalusu v bazální zóně, což negativně ovlivňuje růst explantátů. Vyrůstající nové pupeny byly zduřelé, nově vyrostlé listy byly velmi malé. Při kontaktu jakékoliv části explantátu s médiem, byla pozorována tvorba kalusu (obr. 14). Na tomto médiu nedocházelo k usychání ani k nekrotám. Nové prýty se vytvářely z kalusu. (obr. 15). V některých případech cytokininy na auxiny působí mírně modifikačně. Infekce se na tomto médiu nevytvářela. Po 4 měsících kultivace (4. pasážování) byl množitelý koeficient na tomto médiu 1:32,33. Průměrný nárůst na jeden explantát ve 4. pasážování byl 3,94 výhonů. Počet nově vzniklých rostlin (ks) v jednotlivém pasážování je uveden v tab. 3. I když je množitelý koeficient u tohoto média druhý nejvyšší, médium není z důvodu velké tvorby kalusu a zduřelých prýtů vhodný pro multiplikaci.



Obr. 14 Tvorba kalusu na explantátů z C3 média



Obr. 15 Explantáty na C3 médiu

5.2.5 Médium C4

Médium C4 bylo obohaceno nejnižší dávkou BA a NAA ze všech použitých médií. Rostliny byly v prvních dvou měsících kultivace zelené středního vzrůstu, netrpěly žádnými nedostatky. Ke konci třetího kultivačního období a v průběhu posledního kultivování některé explantáty žloutly, docházelo k růstu výhonků do výšky a na bazální části vznikalo nepatrné množství kalusu (obr. 16). Na některých výhoncích byly pozorovány hnědé nekrotické listy. Hnědé listy nebyly však pozorovány na všech explantátech. Přírůstky na výhoncích byly v posledním kultivačním období

vitirifikované opět s hnědnoucími listy (obr. 17). Množitelský koeficient byl u C4 média 1:6,60. Přehled celkového nárůstu výhonků (ks) v každém pasážování je uveden v tab. 3. Průměrný nárůst ve 4. pasážování na jeden explantát byl 1,9 výhonů.



Obr. 16 Explantáty z C4 média



Obr. 17 Explantáty během kultivace na C4 médiu

6 DISKUZE

Diplomová práce byla zaměřena na aplikaci růstových regulátorů pro multiplikaci *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro*. Multiplikace *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro* není zatím jako produkční metoda v běžné praxi příliš využívána. Je všeobecně známo, že *in vitro* kultivace explantátů je ovlivněna několika vnitřními a vnějšími faktory, jako například složením kultivačního média, druhu rostliny, genotypu, typu explantátu a dalšími kultivačními podmínkami (teplota, fotoperioda). Fytohormony hrají významnou roli při růstu a vývoji rostlin. Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem, a na druhé straně neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný růstový proces (Procházka a kol., 1997).

Při rozmnožování révy vinné v aseptických podmínkách lze využít různé části rostlin. V této práci byly pro založení primárních kultur použity jednonodální segmenty révy vinné. Z celkem čtyř základních odrůd ('MT' 25/7, 'PM' 20/52, 'CR2' 1/48, 'K 5BB') byla ale úspěšně založena pouze odrůda 'CR 2'. Kvůli úhynu segmentů u zmiňovaných odrůd byla multiplikace pozorována pouze u odrůdy 'CR 2'. Faltus (2012) uvádí, že jednonodální segmenty vykazují nízkou regenerační schopnost. Zároveň uvádí, jako vhodný materiál pro multiplikaci révy vinné vícenodální segmenty. Křižan a kol. (2012) využívají, pro multiplikaci révy vinné, segmenty stonků s axilárními nebo bazálními pupeny. Lze také využít segmenty z kultur založených v *in vitro* podmínkách, Nookaraju a kol., (2013). Multiplikovat révu lze i pomocí prašníků, Sunderland a Roberts, (1979), Lopez Perez a kol., (2005), Cutanda a kol., (2008), nezralých vaječniců, Nakano a kol., (1997) a nezralých zygotických embryí Stamp a Meredith, (1988), Tangolar a kol., (2008). Množení pomocí adventivních výhonů v podmínkách *in vitro* popsal Murashige (1974), Gifford a Hewitt (1961), Bini (1976), nebo Galzy (1972).

Pro povrchovou desinfekci jednonodálních segmentů byl v pokusu použit roztok 0,2% HgCl₂. Harris a Stevenson (1982) využily pro povrchovou desinfekci 12 % roztok sava, Singh a kol., (2004) sterilovali více nodální segmenty 0,1% roztokem, HgCl₂, Křižan a kol. (2012) doporučuje osvědčenou koncentraci 0,2% HgCl₂, Abido a kol. (2013) použili pro desinfekci segmentů roztok NaOCl.

Silvestroni, (1981) uvádí, že druh kultivačního média závisí na druhu a kultivaru révy vinné, proto se výsledky v jedné studii velmi často liší s výsledky jiné studie. To by mohlo vysvětlovat rozdíly v minerálním složení a obsahu růstových regulátorů při zakládání primárních kultur a samotné multiplikaci.

Získané výsledky ukazují, že rozdílná koncentrace BA je rozhodující faktor pro stimulaci růstu a rozmnožování explantátů. Koncentrace hormonů v C0 médiu vykazovala nejlepší výsledky ze všech použitých médií, multiplikační koeficient byl na C0 médiu (1:49,6). Díky vhodně zvolené koncentraci BA ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo podpořeno buněčné dělení a tvorba nových pupenů. Kombinace BA ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a IBA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), která byla využita v tomto médiu pozitivně ovlivňovala regeneraci rostlin.

Abido a kol, (2013) využili stejnou kombinaci fytohormonů BA ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), jako byla použita v C1 médiu. Zvolená koncentrace hormonů měla velmi pozitivní vliv na délku a množení explantátů, a však při aplikaci stejného množství hormonů v mé práci na odrůdu 'CR2' 1/48 docházelo k markantnímu úhynu explantátů. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší zvolená koncentrace BA ($3,00 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byla u C1 média, kdy koncentrace hormonů působila na explantáty velmi negativně, protože explantáty měly hnědé skvrny na listech, nekrotizovaly a následně odumíraly, bylo jasně viditelné, že multiplikace v tomto případě neprobíhá, multiplikační koeficient byl na tomto médiu 1: 0,33.

Explantáty na C2 médiu trpěly hyperhydratací (vodnatění pletiv), médium obsahovalo pouze BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Dawn, (1987) uvádí, že vyšší hladina cytokininu v médiu vede k hyperhydrataci explantátů, dříve Chee a Pool (1982) navrhl, že přidáním nízké koncentrace auxinů do média je tento jev minimalizován. Alizadeh a kol., (2010) uvádí, že při koncentraci BA ($4,00 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) dochází velmi často k hyperhydrataci rostlin. Tento jev byl také pozorován u C4 média, kde byla koncentrace BA velmi nízká ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). NAA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) u C4 média měla za následek tvorbu malého množství kalusu. Rostliny byly zakrslé a na okrajích listů byly hnědé skvrny, které se postupem času rozšiřovaly do středu.

Jak je patrné z výsledků na explantátech multiplikovaných na C3 médiu byla pozorována velká vrstva kalusu v bazální části výhonu. Tento jev byl způsoben vysokou koncentrací IBA ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v médiu. Kurmi a kol., (2011) pozorovali vysokou tvorbu

kalusu při přidání 2,4-D ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) do média. Také uvádí, že při přidání jakéhokoliv auxinu do média nad $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ je tvorba kalusu vysoká.

Rozdílné koncentrace různých regulátorů růstu v používaných médiích, mohou mít za následek značnou variabilitu pro *in vitro* kultury různých druhů nebo odrůd. Jeden rostlinný hormon, a především jeho koncentrace, účinný pro jeden druh nebo odrůdu nemusí být účinný pro jiný kultivar nebo druh. (Alizadeh a kol., 2012).

7 ZÁVĚR

Réva vinná je díky svým plodům velmi využívanou rostlinou po celém světě. Ročně je ve světě vysazováno při zakládání vinic několik milionů rostlin révy vinné. Pro získání takového počtu rostlinného materiálu je v současné době poptávka po materiálu velmi vysoká, a proto jsou metody *in vitro* velmi vhodnou variantou. Díky metodám *in vitro* je možné získat velmi vysokého počtu zdravého, uniformního materiálu. Metody *in vitro* umožňují také šlechtit nové odrůdy nejen révy vinné, ale i ostatních druhů rostlin.

V práci Aplikace růstových regulátorů pro multiplikaci *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro*, bylo pracováno se čtyřmi odrůdami révy vinné ('MT' 25/7, 'PM' 20/52, 'CR2' 1/48, 'K 5BB'). Jednonodální segmenty byly kultivovány na MS médium obohaceném o BA (0,7 mg·l⁻¹), IAA (0,1 mg·l⁻¹). Nejlepších výsledků po založení primární kultury bylo dosaženo u odrůdy 'CR 2'. Tato odrůda byla multiplikována na pěti různých komerčně vyrobených médiích s rozlišnými koncentracemi rostlinných hormonů; DKW médium v kombinaci BA (0,6 mg·l⁻¹), IBA (0,01 mg·l⁻¹), jako C0. C0 médium sloužilo, jako kontrolní varianta a doposud se využívá v laboratoři. MS médium v kombinaci BA (3,0 mg·l⁻¹), NAA (0,2 mg·l⁻¹), jako C1 médium; C2D médium v kombinaci BA (1,5 mg·l⁻¹), jako C2 médium; MS médium obohacené o BA (1,5 mg·l⁻¹), IBA (1,0 mg·l⁻¹), jako C3 médium a LQ médium v kombinaci BA (0,4 mg·l⁻¹) a NAA (0,01 mg·l⁻¹), jako C4 médium.

Z výsledků jsou patrné tyto závěry; v prvním pasážování bylo statisticky nejvíce nově vzniklých rostlin na C0 médium (42 kusů) a C3 médium (35 kusů). Nejmenšího nárůstu výhonů bylo v prvním pasážování na C2 médium (20 kusů). Ve druhém pasážování bylo nejvíce nově vzniklých rostlin na C0 médium (79 kusů), velmi podobný počet nově vzniklých rostlin byl na C3 média (77 kusů), nejmenší nárůst nových rostlin ve druhém pasážování byl na C2 médium (13 kusů). Ve třetím pasážování bylo nejvíce nových rostlin pozorováno na C0 médium (186 kusů) a nejméně nově vzniklých rostlin bylo pozorováno u C1 média (15 kusů). Ve čtvrtém pasážování bylo nejvíce nově vzniklých rostlin na C0 médium (744 kusů) a nejmenšího počtu vzniklých rostlin bylo sledováno na C1 média (5 kusů). Z výsledků je patrné, že v jednotlivých pasážováních

se nejlépe dařilo explantátům na C0 médiu a nejhorsích výsledků během multiplikace bylo dosaženo u C1 média.

Bylo zjištěno, že koncentrace BA ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), která byla zvolena u MS médium v kombinaci s NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), neprospívá explantátům. Při takto vysoké koncentraci, nedochází k buněčnému dělení a rostliny odumírají. Na C2D médium v kombinaci s BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byly explantáty vitrifikovány. C2 médium bylo vyhodnoceno, jako nevhodné médium pro multiplikaci révy vinné v podmínkách *in vitro*. U MS média obohaceného o BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a IBA ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byla vypořovávána velmi vysoká tvorba kalusu, což způsobila vysoká koncentrace auxinu v médiu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na DKW médiu v kombinaci BA ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IBA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), kde byl ze čtvrtého pasážování vypočítán nejvyšší multiplikační koeficient.

8 SOUHRN

Diplomová práce byla zpracována na téma aplikace růstových regulátorů na multiplikaci *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro*. K pokusu byl odebrán rostlinný materiál z technického izolátu ZF Mendelu v Lednici. Byly vybrány čtyři odrůdy révy vinné ('MT' 25/7, 'PM' 20/52, 'CR2' 1/48, 'K 5BB'), které byly po založení primární kultury multiplikovány na vybraných médiích. Všechny odrůdy byly kultivovány při stejných teplotních a světelných podmínkách. Pro založení primární kultury bylo u všech odrůd zvoleno MS médium v kombinaci s BA ($0,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a IAA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), pH bylo upraveno na hodnotu 5,8. Nejlepších výsledků po založení primární kultury vykazovala odrůda 'CR 2' 1/48. U ostatních odrůd ('MT' 25/7, 'PM' 20/52 a 'K 5BB') bylo sledováno napadení houbovými a bakteriálními infekcemi, vitrifikace, neprorůstání prýtů a nekrózy jednotlivých segmentů. Odrůda 'CR2' byla po založení primární kultury multiplikována na pěti médiích; DKW v kombinaci BA ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IBA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále jako C0, MS v kombinaci BA ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), NAA ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále jako C1, C2D v kombinaci BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále jako C2, MS obohacené o BA ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IBA ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále jako C3 a LQ v kombinaci BA ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a NAA ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), dále jako C4. Výsledky diplomové práce hodnotí zdravotní stav a úspěšnost explantátů na jednotlivých médiích a propočítávají multiplikační koeficient. Vyhodnocen byl i nárůst nově vzniklých výhonů v jednotlivém pasážování celého experimentu. Nejlépe vyhovujícím médiem pro multiplikaci révy vinné v podmínkách *in vitro*, bylo vyhodnoceno C0 médium. Nejmenší průměrný počet vzniklých výhonů a zároveň i nejhorších výsledků bylo dosaženo na C1 médiu.

RESUME

The experiment was done at Faculty of Horticulture in Lednice, at the Mendeleum – Institute of genetics. The plant materil was obtained from the technical isolation in Lednice. Four selected grape varieties ('MT' 25/7, 20/52'PM','CR2' 1/48,'K 5BB') as primary culture and multiplied in selected media. All varieties were grown at the same temperature and light conditions. MS medium combined with BA ($0.7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), IAA (0.1

mg·l⁻¹) was chosen for the primary culture. The pH was adjusted to 5.8. After the establishment of primary cultures, only the variety 'CR 2' 1/48 survived. In the other varieties ('MT' 07/25, 20/52 and 'PM"K 5BB') infection by fungal and bacterial infections, hyperhydratation, no proliferation of shoots and necrosed individual segments were observed. Variety'CR2' was (after the establishment of primary cultures) multiplied on five media; DKW combination of BA (0.6 mg·l⁻¹), IBA (0.01 mg·l⁻¹), here in after referred to as C0, MS in combination with BA (3.0 mg·l⁻¹), NAA (0, 2 mg·l⁻¹), here in after referred to as C1, C2D combination of BA (1.5 mg·l⁻¹), here in after referred to as C2, MS enriched by BA (1.5 mg·l⁻¹), IBA (1 0 mg·l⁻¹), here in after referred to as C3 and LQ combination of BA (0.4 mg·l⁻¹) and NAA (0.01 mg·l⁻¹) here in after C4. Individual media were evaluated separately with the calculation multiplier of 4 passage. C0 medium was evaluated as the most suitable medium for in vitro grapevine multiplication . The lowest number of new formed shoots and also the worst results were observed on C1 medium. The results of the thesis evaluate the health condition of plants and the multiplication factor on different media. New formed shoots during the ever single passaging was evaluated as well.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABIDO A., ALY M. A. M., SABAH A., HASSANEM, RAYAN G. A (2013). „*In vitro Propagation of Grapevine (Vitis vinifera L.) Muscat of Alexandria cv. For Conservation of Endangerment*“ Middle-East Journal of Scientific Research 13 (3): 328-337. ISSN 1990-9233.

ALBERTS, B. (1998): *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, xxvi, 630 s., příl. ISBN 80-902906-0-4.

ALIZADEH M., SINGH S. K., PATEL V. B. (2010): „*Comparative performance of in vitro multiplication in four grape (Vitis spp.) rootstock genotypes.*“ International Journal of Plant Production 4 (1): 41-50. 1735-6814.

AMBROSI H. (2010): „*Farbatlas Rebsorten: 300 Sorten und ihre Weine*“. 3., Auflage. Stuttgart: Ulmer, E. ISBN 9783800159574

ASCENSIÓN I., MANUEL V., MORTE V. (2005): „*Establishment and in vitro clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon: an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones.*“ Anales de biología (27). ISSN: 211-220.

BAJAJ, Y. P. S. (1986): *Biotechnology in agriculture and forestry*. 1986

BOUQUET, A. (1989): „*Interêt des techniques de culture in vitro pour l'amélioration génétique de la Vigne.*“ Bull OIV 697-698: 197-192

BOURGIN, J. P., NITSCH, J. P. (1967): *Ann, Physiol. Vég.* 9: 377

CUTANDA, M., C., BOUQUET, A., CHATELET, P., LOPEZ, G., BOTELLA, O., MONTERO, F., J., TORREGROS, L. (2008): *Somatic embryogenesis and plant regeneration of Vitis Vinifera cultivars 'macabeo' and 'tempranillo'*. *Vitis*. 47: 159-162.

DAWN, M., M. (1987): *In vitro studies on grapes (Vitis vinifera L.)*. Thesis submitted to P.G. School, I.A.R.I. New Delhi, India.

- DEV, R., SINGH, S., SINGH, A., VERMA, M. (2015): „*Comparative in vitro multiplication of some grape (Vitisvinifera) genotypes*“. *INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES* 85 (11). ISSN: 0019-5022
- DOHNAL, T., V., KRAUS. (1968): *Pěstování révy a zužitkování hroznů*. 1. vyd. Praha: SZN, 266, [4] s.
- DRIVER, J., A., KUNIYUKI, A., H. (1984): *In vitro propagation of paradox walnut rootstock*. Hort. Science 19(4).
- DUCHEFA, CATALOGUE. (2010-2012):, *Plant Cell and Tissue Culture, Phytopathology, Biochemicals, Duchefa Biochemie B.V., Haarlem*. The Netherlands, 192 pp
- EARLE, E. D., LANGHANS, R: W.(1974): J, Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 128.
- EDWIN F. GEORGE, MICHAEL A. HALL, GEERT-JAN DE KLERK, EDITORS. VOL. 1, THE BACKGROUND. (2007): *The background. Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Dordrecht: Springer. ISBN 9781402050046.
- FALTUS M. (2012): *Kultivace révy vinné v in vitro podmínkách: certifikovaná metodika* [online]. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, [cit. 2014-04-08]. ISBN 978-80-7427-106-9.
- FIŠEROVÁ H., HRADILÍK, J. (1996): *Produkce etylenu a etanu kalusovou kulturou révy vinné. (Ethylene and ethane production by vine callus culture)*. Rostlinná výroba, 42, 517-512.
- GALET, P. (2000): *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Paris: Hachette Pratique. ISBN 9782012363311.
- GALZE, R. (1972): *La culture in vitro des apex de Vitis rupestris*. CR Acad Soc Biol paris 275.
- GIFFORT, E. F., HEITT, W. M. B. (1961): *The use of therapy and in vitro shoot tip culture to eliminate fanleaf vines from the grape vine*. Am. J. onol. Vitic12.
- HARRIS, R., E., STEVENSON, J.,H. (1982): *In vitro propagation of Vitis*, Vitis 41.

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

HRONSKÝ, Š. (2006): *Vinárstvo*. 1. přeprac. vyd. Nitra: Vydavateľstvo SPU, 128 s. ISBN 80-8069-774-4.

CHEE, R., POOL, R., M. (1982): *The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices in Vitis cultured in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 16.

CHÉE R., POOL, R., M. (1987): *Improved Inorganic Media Constituents for In Vitro Shoot Multiplication of Vitis*. *Scientia Horticulturae* 32, s. 85-95.

CHLOUPEK, O. (1995): *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 186 s. ISBN 80-200-0207-3.

IRIBE R., COTERA F., GONZALES Ch. *World journal of mikrobiology*. Jun 2011. Springer, 233 Springer ST, New York, NY 10013 USA, 2011. ISBN 0959-3993.

KINCL, M., V., KRPEŠ. (2000): *Základy fyziologie rostlin*. 2. dopl. vyd. Ostrava: Montanex, 221 s. ISBN 80-7225-041-8.

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

KRAUS, V., Z., FOFFOVÁ, B., WURM. (2008): *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica. ISBN 80-86767-00-0.

KRAUS, V.: In ACKERMANN, P, KONEČNÝ, A., KRAUS, V., MICHLOVSKÝ, M., SEDLO, J., STÁVEK, R., (2002): *Vinařský slovník*. 1. Vyd Praha: Radix. ISBN 80-860-3134-9.

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

KRAUS, V., Z., KUTTEL, V., B., VURM. (1997): *Encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Vurm, Foffová, 223 s. ISBN 80-902363-3-2.

- KŘIŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., MOUDRÁ, J. (2012): *The effect of media composition on multiplication of grape root stocks in vitro*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LX, No. 8, pp. 141–144
- KURMI, U., S., SHARMA, D., K., TRIPATHI, M., K., TIWARI, R., BAGHEL, B., S., TIWARI, S. (2011): *Plant regeneration of Vitis vinifera (L) via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments*. Journal of Agricultural Technology 7(3): 721-737.
- KUTINA J., HUBÁČEK V., ACKERMANN P. (1991): *Pomologický atlas 1*. Vyd. 1. Ilustrace Marie Suchardová, Pavel Dvorský, Gašpar Vanek. Praha: Brázda, 287 s. ISBN 80-209-0089-6.
- KUTINA J. (1988): *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 414 s.
- LIU S. C., CHEN W. Q., FANG K., JIANG X. N., GAI Y. (2012): *Classification and characterization of unknown cytokinins into essential types by in-source collision-induced dissociation electrospray ionization ion trap mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 26(17): 2075-2082.
- LOPEZ-PEREZ, A.J., CARRENO J., MARTINEZ, C., A., DABAUZA, M. (2005): *High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (Vitis vinifera L.) induced by activated charcoal*. Vitis. 44: 79-85.
- MARCINSKA I., CZYCYLO-MYSZA I., SKRZYPEK E., GRZESIAK M. T., JANOWIAK F., FILEK M., DZIURKA K., WALIGORSKI P., JUZON, K., CYGANEK, GRZESIAK, S. (2013): *Alleviation of Osmotic Stress Effects by Exogenous Application of Salicylic or Abscisic Acid on Wheat Seedlings*. International Journal of Molecular Sciences 14(7): 13171-13193. ISSN 1422-0067.
- MICHLOVSKÝ, M.: In ACKERMANN, P., KONEČNÝ, A., KRAUS, V., MICHLOVSKÝ, M., SEDLO, J., STÁVEK, R. (2002): *Vinařský slovník*. 1. Vyd Praha: Radix, 335 s. ISBN 80-860-3134-9.
- MURASHIGE, T., SHABDE, M. N., HASEGAWA, P. M. (1972): J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 97: 158.

- MURASHIGE, T. (1974): *Annu.Rev.Plant Physiol.*
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): *Physiol. Plant.*
- NAKANO, M., SAKAKIBARA, T., WATANABE, Y., MII, M. (1997): *Establishment of embryogenic culture in several cultivars of Vitis vinifera x Vitis labruscana. Vitis.* 36: 141-145
- NÁTR, L. (1998): *Rostliny, lidé a trvale udržitelný život člověka na Zemi.* 1.vyd. Praha: Karolinum, 135 s.
- NEGRUL, A. M., (1946): *Origin of cultivated grapevine and its classification.* Ampelographia SSSR, Moskva, I. Díl, 159-216.
- NOOKARAJU, A., BARRETO, S. M., AGRAWAL, D. C. (2008): *Rapid in vitro propagation of grapevine cv. Crimson Seedless - Influence of basal media and plant growth regulators.* Journal of Applied Horticulture 10(1): 44-49.
- NOVÁK, F., J. (1990): *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin.* 1. vyd. Praha: Academia, 208 s. ISBN 80-200-0344-4.
- OLINEVICH O. V., KHOKHLOVA L. P. (2003): *Effects of abscisic acid, low temperature, and plant age on cytoskeleton and phosphorylated proteins.* Biochemistry-Moscow 68(6): 678-687, ISSN 0006-2979.
- OLMO, H., P., (1976): *Grapes: Vitis, Muscadinia (Vitaceae).* 294-298. In: Simonds, N. W. (ed.). *Evolution of crop plants.* Longman. New York.
- PAVLOUŠEK, P. (2011): *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví.* Praha: Grada, 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.
- PLANCHON, J. E. (1887): *Monographie des Ampélideae vraies.* Monographia Phanerogamerum, 5: 305-364.
- POLÁK, J. (2009): *Ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a in vitro kultur: certifikovaná metodika.* Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 68 s. ISBN 978-80-87030-15-8.

- PROCHÁZKA S., HUBÁČEK V., ACKERMANN P. (1998): *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Ilustrace Marie Suchardová, Pavel Dvorský, Gašpar Vanek. Praha: Academia, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- PROCHÁZKA S., ŠEBÁNEK J. (1997): *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 395 s. ISBN 80-200-0597-8.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. (1977): *Improved medium for in vitro culture of Prunus sp. Acta. Hort.* 78, s. 437-442.
- RAZDAN, M. (2003): *Introduction to plant tissue culture*. 2nd ed. Enfield, NH: Science Publishers, xii, 375 p. ISBN 1578082374.
- RAGHAVAN, V. (1980): *Intern. Rev. Cytol., Suppl.* 11b: 209
- SILVESTRONI, O. (1981). *Prime esperienze sulla micropropagazione della vite europea*. *Vignevini* 8 (10), 31-37
- SINGH, S., K., KHAWALE, R., N., SINGH, S., P. (2004): *Technique for rapid in vitro multiplication of Vitis vinifera L. cultivars*, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79:2, 267-272
- SKOOG, f., MILLER, C. O.(1957): *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118.
- SOTOLÁŘ R. (2016): *Multimediální atlas podnožových, moštových a stolních odrůd révy*, Mendelova zemědělská a lesnická universita Brno, zahradnická fakulta v Lednici.
- STAMP, J., A., MEREDICH, C., P. (1988): *Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine*. *Sci. Horti.* 35: 235-250.
- ŠEBÁNEK, J., SLADKÝ, Z. (1988): *Biotechnologie rostlinných explantátů*, VŠZ Brno, 19-100
- ŠIMEK M. (2008-2012): *Encyklopédie všemožnejch odrůd révy vinné z celého světa s přihlédnutím k těm, co již úplně vymizely*.
- ŠVÁBENSKÁ, Z.,(2011): *Rostlinky ze zkumavky – za tajemstvím kultivace in vitro*. *Životní styl*. ISSN 1801 – 7274.

- ŠVIHRA J. (1989): *Fyziológia rastlin*. Vyd. 2. Bratislava: Príroda, 348 s. ISBN 80-07-00049-6.
- TAKAHASHI N., KITAMURA H., KAWARADA A., SETA Y., TAKAI M., TAMURA S., SUMIKI Y., (1995): *Bulletin of the agricultural chemici society of Japan*. ISSN: 0002-1369.
- TANGOLAR, S., G., BUYUKALACA, S., ERGENOGLU, F. (2008): *High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: the effect of genotype, media, 2,4-D and incubation conditions*. Turk J. Agric. 32: 311-317.
- UNDERLAND, A., ROBERTS, M. (1979): *An Bot.* 43: 405
- VANEK, G. (1996): *Vinič 2 - ochrana: Integrovaná produkcia hrozna. Ekol. a ekonom.pestovanie, výživa a ochrana*. 1.vyd. Bratislava: Príroda, 206 s. ISBN 80-07-00758-x.
- VANEK, G. (1996): *Vinič 3 - pestovanie: Integrovaná produkcia hrozna. Ekol. a ekonom.pestovanie, výživa a ochrana*. 1.vyd. Bratislava: Príroda, 150 s. ISBN 80-07-00759-8.
- WALTER, V. (1997): *Rozmnožování okrasných stromů a keřů*. 2.vyd. Praha: Brázda, 310 s. ISBN 80-209-0268-6.
- WERNICKE, W., KOHLENBACH, H., W. (1975): *Z. Pflanzenphysiol.* 77, 89
- ZECCA, G., De MATTIA, F., LOVICU, G., LABRA, M., SALA, F., GRASSI, F., (2009): *Wild grapevine: silvestris, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia*. Plant Biology, 12: 558-562.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1 Mikropropagace *Vitis vinifera* L. v podmínkách *in vitro* dle (Abido a kol., 2013)
A) révové explantáty při zakládání primární kultury, B) prorůstání úžlabních pupenů, C)
multiplikace révy vinné

Obr. 2 'Müller Thurgau' 25/7

Obr. 3 'Modrý Portugal' 20/52

Obr. 4 'Kober 5BB'

Obr. 5 'CR 2' 1/48

Obr. 6 Schéma pokusu

Obr. 7 Erlenmayerovy baňky s chloridem rtuťnatým a nodálními segmenty révy vinné

Obr. 8 Jednonodální segmenty připravené ke kultivaci

Obr. 9 Prorostlé úžlabní pupeny u odrůd 'MP' 20/52, 'MT' 25/7, 'CR2' 1/48, 'K5 BB'

Obr. 10 Rostliny na C0 médiu během multiplikace

Obr. 11 Rostliny na C0 médiu při napadení infekcí

Obr. 12 Rostliny na C1 médiu během multiplikace

Obr. 13 Explantáty během multiplikace na C2 médiu

Obr. 14 Tvorba kalusu na explantátů z C3 média

Obr. 15 Explantáty na C3 médiu

Obr. 16 Explantáty z C4 média

Obr. 17 Explantáty během kultivace na C4 médiu

Obr. 18 Flowbox, prostor pro práci v *in vitro* podmínkách

Obr. 19 Kultivační místnost s regály

Obr. 20 Srovnání explantátů na jednotlivých médiích

Obr. 21 Srovnání explantátů na C4 médiu (na levo) a C2 médiu (na pravo) médiu

Obr. 22 Srovnání explantátů na C0 médiu (na levo) a C3 médiu (na pravo)

Obr. 23 Srovnání explantátů na C0 médiu (na levo) a C4 médiu (na pravo)

Obr. 24 Srovnání explantátů na C0 médiu (na levo) a C1 médiu (na pravo)

Tabulka 1: Účinky nejčastěji využívaných rostlinných regulátorů v kultivačních médiích (Hradilík, 2005)

Tabulka 2: Úspěšnost převodu rostlin do aseptických podmínek (počet rostlin v ks)

Tabulka 3: Celkový počet rostlin na počátku multiplikace a v průběhu jednotlivých pasážování.

Graf 1: Průměrný počet vzniklých rostlin na jednotlivých médiích po 1. pasážování.

Graf 2: Průměrný počet rostlin vzniklých na jednotlivých médiích po 2. pasážování.

Graf 3: Průměrný počet vzniklých rostlin na jednotlivých médiích po 3. pasážování.

Graf 4: Průměrný počet vzniklých rostlin po 4. pasážování na jednotlivých médiích.

Graf 5: Celkový počet rostlin (ks) po 4. pasážování.

Graf 6: Srovnání počtu nově vzniklých rostlin při multiplikaci v jednotlivých pasážováních