

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Využití *in vitro* kultur pro množení gerber (*Gerbera* sp.)

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Miroslav Macák

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití *in vitro* kultur pro množení gerber (*Gerberasp.*)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob a jsem autorem všech uveřejněných fotografií.

V Praze dne 8.4. 2015 _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování této diplomové práce.

Využití *in vitro* kultur pro množení gerber (Gerbera sp.)

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá postupem při mikropropagaci gerberky (*Gerbera* sp.). Jako pokusný materiál bylo zvoleno šest odrůd gerber – Abriana, Ruble, Amparo, Black Out, Bellagio, Adinda. Byl zkoumán vliv sterilizačního činidla na životaschopnost explantátu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u 3,5% roztoku chlornanu sodného, který vysterilizoval 10,42% explantátů, což bylo potvrzeno chímí testem shody četností kontaminovaných explantátů. Dále se věnuje ovlivnění organogeneze *in vitro* růstovými regulátory a genotypem. Ze zjištěných výsledků nelze přesně říci, že indukce kalusu je ovlivněna genotypem a růstovými regulátory obsaženými v kultivačním mediu, protože výsledky byly značně ovlivněny kontaminacemi. Ve fázi multiplikace taktéž nelze přesně určit, zda koncentrace hormonů v mediu ovlivňuje multiplikaci. Jen při porovnání výsledků u odrůd Adinda a Black Out je zřetelné, že odrůda Adinda reagovala odlišně na všechna multiplikační media MLT1 (MS + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA), MLT2 (MS + 2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA), MLT3 (MS + 3,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) tj. tvořila jen skelné listy. Z dosažených výsledků nelze stanovit, zda genotyp a koncentrace regulátorů v mediu mají vliv na zakořeňování rostlin. Pouze odrůda Black Out zakořenila na mediích MK1 (MS + 0,5mg/l NAA), MK2 (MS + 1,0mg/l NAA) a MK3 (MS + 2,0 mg/l NAA). Výsledky nepotvrdily ani nevyvrátily hypotézu, že substrát použitý pro převedení rostlin do *in vivo* podmínek má vliv na životaschopnost rostlin. V substrátu složeného z 50% z perlitu a z 50% z rašeliny přežilo všech 6 rostlin a v čistém perlitu přežilo taktéž všech 6 rostlin.

Klíčová slova: *Gerbera* sp., *in vitro*, mikropropagace, regenerace, organogeneze.

Using *in vitro* cultures for *Gerbera* sp. propagation

Summary

This thesis deals with the procedure of micropropagation of *Gerbera* sp. As experimental material has been selected six varieties of gerbera - Abriana, Ruble, Amparo, Black Out, Bellagio, Adinda. It also deals with influence of the sterilizing agent on the viability of explant. The best result was achieved with 3.5% sodium hypochlorite solution, which sterilized the explants 10.42%, which was confirmed by the chi test of equivalence frequency of contaminated explants. It also discusses the influence of grow regulators to organogenesis *in vitro*. The observed results can not be accurately interpreted because callus induction is affected by contamination. In phase multiplication it also can not be accurately determined because of the losses in sterilization process. Just when comparing the results with a variety Adinda Black Out is clear that a variety Adinda responded differently to all media MLT. MLT1 (MS + 1.0 mg / l BAP + 0.1 mg / l NAA), MLT2 (MS + 2.0 mg / l BAP + 0.1 mg / l NAA) MLT3 (MS + 3.0 mg / l BAP + 0.1 mg / l NAA). Adinda formed only glass leaves. From obtained results can not be determined that genotype and concentration of regulators have an effect on rooting. Only varieties Black Out rooted on media MK1 (MS + 0.5 mg / l NAA), MK2 (MS + 1,0mg / l NAA) and MK3 (MS + 2.0 mg / l NAA). Results did not confirm or prove hypothesis that the substrate used for transferring the plants to *in vivo* conditions will affect the viability of the plant. In the substrate consisting of 50% perlite and 50% peat survived all six plants and in clean perlite also survived all six plants.

Keywords: *Gerbera* sp., *in vitro*, micropropagation, regeneration, organogenesis.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíl práce a hypotézy	10
2.1	Hypotéza č.1.....	10
2.2	Hypotéza č.2.....	10
2.3	Hypotéza č.3.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	Původ a význam gerbery.....	11
3.2	Popis rostliny a pěstební podmínky	11
3.2.1	Popis rostliny.....	11
3.2.2	Přirozené podmínky.....	11
3.2.3	Podmínky při skleníkové produkci.....	12
3.3	Vegetativní rozmnožování gerber	12
3.3.1	Tkáňové kultury (metoda <i>in vitro</i>).....	13
3.3.2	Kultivace přímou organogenezí.....	13
3.3.3	Kultivace nepřímou organogenezí.....	13
3.3.4	Rozmnožování gerber <i>in vitro</i>	14
3.3.5	Fáze mikropropagace podle George et al. (2008).....	14
3.3.5.1	Fáze 0.....	14
3.3.5.2	Fáze 1.....	14
3.3.5.3	Fáze 2.....	14
3.3.5.4	Fáze 3.....	15
3.3.5.5	Fáze 4.....	15
3.4	Vybavení pro <i>in vitro</i> kultivaci rostlin.....	15
3.4.1	Pro přípravu media.....	15
3.4.2	Pro izolaci kultur.....	15
3.4.3	Obecné vybavení.....	15
3.4.4	Chemikálie.....	15
3.4.5	Kultivační skříň nebo místnost.....	15
3.4.6	Skleník.....	16
3.5	Rostlinný materiál	16
3.5.1	Explantát.....	16
3.5.1.1	Roční období.....	17
3.5.1.2	Stáří a zdravotní stav rostliny.....	17
3.5.1.3	Stáří explantátu.....	17
3.5.1.4	Velikost explantátu.....	17

3.5.1.5	Vhodnost explantátu	17
3.5.1.6	Pozice explantátu na rostlině	18
3.5.1.7	Růstové podmínky.....	18
3.5.1.8	Řez explantátu.....	18
3.5.2	Kontaminace	18
3.5.3	Sterilizace	18
3.5.3.1	Rostlinný materiál	19
3.5.3.2	Media	19
3.5.3.3	Nástroje.....	19
3.5.3.4	Flow box	20
3.5.3.5	Pracovník.....	20
3.6	Příprava a složení media	20
3.6.1	Voda	20
3.6.2	Agar	20
3.6.3	Cukr	21
3.6.4	Minerální složky	21
3.6.5	Rostlinné hormony	21
3.6.5.1	Auxiny.....	22
3.6.5.2	Cytokininy.....	22
3.6.6	Vitamíny	22
3.7	Převod z <i>in vitro</i> do přirozených podmínek	22
4	Materiál a metody	23
4.1	Rostlinný materiál	23
4.1.1	Explantát	24
4.1.2	Sterilizace	24
4.2	Medium	24
4.2.1	Příprava a sterilizace	25
4.3	Podmínky kultivace	25
4.4	Postup kultivace	25
5	Výsledky	27
5.1	Pokus č. 1	27
5.2	Pokus č. 2	29
5.3	Pokus č. 3	31
6	Statistické zhodnocení dat.....	38
6.1	Sterilizace.....	38
6.2	Životaschopnost kalusu	39

6.3	Multiplikace	39
7	Diskuse	40
8	Závěr	43
9	Seznam literatury	44
10	Samostatné přílohy	46
	Seznam příloh.....	46

1 Úvod

V dnešní době se setkáváme s pěstovanými rostlinami, které vlivem šlechtění „ztratily“ schopnost generativního rozmnožování. Mezi tyto rostliny patří i některé kultivary gerber pěstovaných pro řez květů. Klasickým vegetativním množením jako je řízkování dosáhneme uspokojivých výsledků jen pro domácí pěstování, kdy lze z jedné rostliny získat jen omezené množství životaschopných jedinců. Při této metodě jsou mladé rostliny napadány houbovými chorobami a procento přeživších rostlin se značně snižuje.

Proti tomu *in vitro* kultivace rostlin umožňuje v relativně malém prostoru namnožit velký počet zdravých sazenic a proto je jí hojně využíváno v zemědělské velkoprodukci rostlin a sadbového materiálu. Předložená práce se zaměřuje na problematiku odvození *in vitro* kultury gerber a mapuje nezbytné technologické podmínky pro realizaci množení gerber *in vitro*.

2 Cíl práce a hypotézy

Diplomová práce se zabývá převedením nesterilního rostlinného materiálu do aseptických podmínek *in vitro*. K tomuto účelu jsou zkoumány vlivy různých sterilizačních činidel.

Dílčím cílem práce je ověřit vliv koncentrace růstových hormonů na organogenezi *in vitro* a v neposlední řadě podmínky převodu do *ex vitro*.

Cílem práce je tedy ověření následujících hypotéz.

2.1 Hypotéza 1

Sterilizační činidlo má vliv na životaschopnost kultivovaného materiálu.

2.2 Hypotéza 2

Genotyp a koncentrace růstových hormonů ovlivňuje přímo indukci kalusu, tvorbu primordií, prýtlů a kořenů *in vitro*.

2.3 Hypotéza 3

Substrát použitý pro převedení rostlin do *in vivo* podmínek má vliv na životaschopnost rostlin.

3 Literární přehled

3.1 Původ a význam gerbery

Rod *Gerbera* patří do čeledi *Asteraceae* zahrnuje asi 45 druhů vesměs vytrvalých bylin s oblastí rozšíření ve východní části jižní Afriky, na Madagaskaru, v Indii až po Nepál a Čínu. V zahradnictví je významný pouze jeden druh *Gerberajamesonii* původem z Jihoafrické republiky, který byl objeven roku 1878 (Atanasova, 2001).

Další důležité druhy jsou *Gerbera aspleifolia*, *Gerbera aurantiaca*, *Gerbera kunzeana*, *Gerbera viridifolia*, atd. Rod *Gerbera* byl pojmenován na počest německého přírodovědce Traugotta *Gerbera* (Nguyen, 2007).

Gerbera jamesonii byla objevena v roce 1878 v Transvaalu Rehmanem a přesně ji popsal J. D. Hooker. První živé rostliny byly dovezeny do Evropy (Kew Garden u Londýna) v roce 1887 (Votruba, 1980).

Dnes je jednou z nejvýznamnějších květin na trhu s řezanými květinami a patří k nejžádanějším řezaným květinám u nás i ve světě. Patří mezi 5 nejprodávanějších řezaných květin na nizozemských burzách. Oblíbenost stoupá s nově vyšlechtěnými odrůdami, které se pyšní různými barvami a různě plnými květenstvími (Pokluda, 2011)

3.2 Popis rostliny a pěstební podmínky

3.2.1 Popis rostliny

Gerbera vytváří typické květenství pro čeleď hvězdnicovitých (*Asteraceae*), tj. úbor. Úbory vyrůstají na dlouhých stvolech z paždí listů a jsou složeny trubkovitých květů ve středu květenství a z jazykovitých květů na okraji (Votruba, 1980).

Listy jsou uspořádány růžicovitě na konci zkrácených výhonů, kterých se u starších rostlin tvoří hned několik. Kořenový systém je tvořen menším počtem silných kořenů, z nichž vyrůstají slabé postranní kořeny. U kulturních rostlin je kořenový systém víceméně svazčitý a nevytváří se hlavní kořen (Votruba, 1980).

3.2.2 Přirozené podmínky

Gerbera pochází z teplých oblastí jižní Afriky, kde jsou léta teplá a deštivá a zimy naopak suché a chladnější. Během zimního období od května do září rostliny prodělávají vegetační klid. *Gerberajamesonii* neroste v domovině na otevřených stanovištích, ale mezi

trávou a řídkými keři v silném difúzním světle. Půda je propustná, písčitohlinitá s vyšším obsahem humusu a s hodnotou pH 5-6 (Votruba, 1980).

3.2.3 Podmínky při skleníkové produkci

Gerbera pěstovaná pro řez květů při optimálních světelných a tepelných podmínkách při dobré péči bohatě kvete. V ideálních podmínkách při skleníkové produkci gerbera nemá klidové období jako je tomu v její domovině (Pokluda, 2011).

Produkční porosty se udržují 1-1,5 až 2 roky podle zvolené technologie a výkonnosti odrůdy. Za zastaralý pěstební systém už lze považovat pěstování gerber v půdním záhonu. Zderostliny trpí houbovými chorobami. Nejvyšší produkci dává pěstování hydroponické a kontejnerové. Hydroponický systém využívá lehké konstrukce vyvýšených záhonů s umělohmotnými žlaby, na které se umisťují pásy minerální plsti zabalené ve folii a do nichž se vysadí mladé rostliny. Výživa rostlin je zajištěna kapilárami, které jsou napojeny na hlavní přívodní hadici. Přebytečný roztok odtéká z čedičové plsti proříznutým otvorem ve folii a následně je shromažďován v žlabu (Pokluda, 2011).

Pro kontejnerové výsadby se volí 8 až 12 litrové nádoby s rašelinovým nebo kokosovým substrátem. Závlaha a výživa je řešena podobně jako u hydroponického pěstování. Kontejnery jsou umístěny v řadách a pod nimi je taktéž umístěn žlab pro shromažďování přebytečného odpadního živného roztoku (Pokluda, 2011).

Na výživu jsou gerberky středně náročné, z makrobiogenních prvků upřednostňují dusík (N) a draslík (K). Ze stopových prvků jsou důležité měď (Cu), molybden (Mo), bor (B), mangan (Mn), železo (Fe). Optimální pH se liší podle odrůdy, ale pohybuje se mezi 5,5 a 6,5. Ideální teplota pro pěstování gerber je 18 až 22°C. Při teplotách pod 15°C rostliny omezují růst a pod 12 °C se uvádí do klidu. Výnos je odrůdově odlišný a pohybuje se od 25 do 35 květů a více z rostliny za rok (Pokluda, 2011).

3.3 Vegetativní rozmnožování gerber

Gerberky pěstované k řezu květů se semeny nemnoží. Tradičním způsobem vegetativního množení je dělení starších rostlin. Je to sice rychlý, ale málo vydatný způsob množení. Při řízkování se získá z jednoleté rostliny 7 – 15 řízků a ze dvouleté až 30 řízků. Při dnešních objemech produkce řezaných květů gerber je absolutně nedostačující, proto se pro množení gerber využívá množení in vitro, které umožní získat velké množství vyrovnaného a zdravého materiálu pro výsadbu (Vít a kol., 2001).

3.3.1 Tkáňové kultury (metoda *in vitro*)

Tkáňové kultury jsou technikou využívanou pro kultivaci buněk, tkání a orgánů na syntetických mediích v aseptickém prostředí. Rovněž je nutné, aby podmínky jako jsou světlo, teplota a relativní vzdušná vlhkost byly kontrolovány. Schopnost kultivace rostlinných buněk je aplikovatelná v mnoha odvětvích např. zemědělství, zahradnictví, biologie, chemie a je předpokladem pro genetické inženýrství rostlin (Davey, 2010).

Množení v podmínkách *in vitro* se používá u druhů, které se obtížně množí semeny nebo vegetativně, u nichž je tento způsob ekonomicky výhodnější. Množení *in vitro* je náročné na laboratorní zařízení, na přístroje, na speciální chemikálie a odbornost pracovníků. Ekonomická výhodnost proti klasickým způsobům množení je dána vysokým počtem získaných jedinců, úsporou velkých ploch pro mateční rostliny a dobrým zdravotním stavem mladých rostlin. *In vitro* množení je také výhodné pro rychlé rozmnožení nových odrůd (Volf, 1991).

3.3.2 Kultivace přímou organogenezí

Přímá organogeneze vychází z organizovaného růstu, kdy se kultivují izolované vegetativní orgány rostlin. Pro množení rostlin metodou *in vitro* jsou nejdůležitější tyto typy kultur (George et al., 2008):

- Meristémové kultury: U těchto kultur se využívá dělivé pletivo z vrůstného vrcholu rostliny. Po odebrání 0,2 – 1,0 mm velké části vrůstného vrcholu, se tato část kultivuje a lze získat velké množství rostlin.
- Tvorba prýtů z axilárních pupenů. Kultivuje se vrchol rostliny, který je větší než při meristematických kulturách. Vrchol rostliny obsahuje zárodky listů a vrůstných vrcholů, ze kterých jsou produkovány další klony rostlin.
- Kultivace jednonodálních stonkových segmentů. Kultivují se segmenty rostlin s jedním laterálním očkem, ze kterého vyrůstá prýt.
- Kořenové kultury

3.3.3 Kultivace nepřímou organogenezí

Kultivace nepřímou organogenezí spočívá v indukci celé rostliny nebo její části z neorganizovaných buněk. Využívá se totipotence rostlinné buňky. Každá buňka rostliny totiž nese kompletní genetickou informaci a lze z ní za daných podmínek dopěstovat celou rostlinu.

- Kalusové kultury: Kalus je neorganizovaná masa dělících se rostlinných buněk, ze které lze kultivovat rostlinné orgány či celé rostliny.
- Buněčné kultury: Populace rostlinných buněk a malých shluků buněk rozptýlených v provzdušněném tekutém mediu.
- Protoplastové kultury: Kultury izolovaných rostlinných buněk bez buněčné stěny (George et al., 2008).

3.3.4 Rozmnožování gerber *in vitro*

Pierik (1973) uvádí, že lze gerbery množit přímou a nepřímou organogenezí. Lze využít různé explantáty nezralá či zralá květenství, listy, zárodky listů a květenství atd. (Pierik, 1987).

Murashige et al. (1974) objevili systém *in vitro* množení gerber, díky kterému je možné získat mnoho klonů gerber. Izolovali vrůstný vrchol z rostliny, který obsahoval velké množství zárodků listů. Pomocí vysokých koncentrací cytokininů se vyvinulo velké množství axilárních pupenů v úžlabí listů. Tyto nové výhony byly rozděleny a převedeny do čerstvého media, na kterém se znovu tvořily vrůstné vrcholy (Pierik, 1987).

Semena byla kultivována na základním MS mediu (Dhal, 2012).

3.3.5 Fáze mikropropagace podle George et al. (2008)

3.3.5.1 Fáze 0

Před mikropropagací se selektují rostliny pro odběr explantátu. Musí mít znaky typické pro danou odrůdu a prosté jakýchkoliv symptomů infekce.

3.3.5.2 Fáze 1

Tento krok zahrnuje převedení rostlinného materiálu do podmínek *in vitro*. Fáze je úspěšná pokud se převede materiál, který je bez mikrobiálních kontaminací a postupně vykazuje růst (tvorba kalusu). Kontaminované explantáty nebo media se odstraňují.

3.3.5.3 Fáze 2

Cílem druhé fáze je produkce struktur, u kterých se vyskytují zárodky rostlinných orgánů. Z těchto zárodků lze kultivovat životaschopné rostliny.

3.3.5.4 Fáze 3

Při třetí fázi se formují rostliny, které jsou schopny samostatné fotosyntézy a nepotřebují dodatečný přísun uhlovodíků. Fázi lze rozdělit na dvě části, kdy při první části dochází k elongaci struktur, které byly vytvořeny při druhé fázi. V druhé části dochází k zakořeňování elongovaných orgánů rostlin.

3.3.5.5 Fáze 4

V této fázi jsou rostliny převáděny do přirozených podmínek (z *in vitro* do *ex vitro*). Z rostlin se omyje zbytek kultivačního media a přesadí se do nového substrátu (perlit, rašelina). Poté se rostliny udržují několik dní při zvýšené vlhkosti a nižší intenzitě světla. Rostliny byly kultivovány v podmínkách s vysokou vlhkostí a nižší intenzitou světla, proto se při převádění do *ex vitro* podmínek rostliny postupně navykají na přirozené podmínky.

3.4 Vybavení pro *in vitro* kultivaci rostlin

Pierik (1987) doporučuje:

3.4.1 Pro přípravu media

Mikrovlnná trouba, magnetické míchadlo, autokláv, váhy s přesností (0,1 mg a 0,01 mg).

3.4.2 Pro izolaci kultur

Laminární box, plynový kahan, petriho misky, skalpely, pinzety, nůžky, vitafilm na obalení sklenic.

3.4.3 Obecné vybavení

Lednice s mrazákem k uchování chemikálií a medií, nástroje pro čištění použitého laboratorního skla.

3.4.4 Chemikálie

Detergent, etanol.

3.4.5 Kultivační skříň nebo místnost

Kontrolovaná teplota (17 – 27°C), asimilační osvětlení, alarm pro případ selhání.

3.4.6 Skleník

Pro mateční rostliny a pro dopěstování namnožených rostlin.

3.5 Rostlinný materiál

Pro *in vitro* kultury můžeme izolovat dva druhy materiálu z rostlin pěstovaných v kontrolovaných podmínkách ve skleníku nebo z rostlin co jsou pěstovány venku. Pokud je explantát izolován z jedince, který roste ve venkovních podmínkách, je tu velká pravděpodobnost, že bude obsahovat mnohem více infekcí. Výjimkou jsou explantáty izolované z vnitřních tkání. Lze proto říci, že je nutné používat rostlinný materiál pěstovaný ve skleníku, proto upřednostňujeme explantáty z rostlin pěstovaných v krytých prostorách. Reakce materiálu z venkovních podmínek se liší od materiálu pěstovaného ve skleníku. Obecně, materiál ze skleníku (více elongovaný a etiolizovaný) regeneruje lépe (Pierik, 1987).

Před odebráním explantátu z rostliny Pierik (1987) doporučuje:

- Předcházet napadení škůdci, kteří přenáší choroby (mšice, svilušky, molice, atd.)
- Zabránit rozšíření hub a bakterií. Jestli můžeme, ošetřujeme rostliny fungicidy nebo baktericidy.
- Nezalévat rostlin z vrchu, ale do podmisky. Voda je vždy dobrým prostředím pro namnožení mikroorganismů. Toto pravidlo platí zejména pro rostliny, které tvoří růžice.
- Ve skleníku udržovat co nejnižší relativní vzdušnou vlhkost. Houbové a bakteriální choroby lépe přežívají při vyšší vlhkosti vzduchu.
- Explantát se odebírá ze suchých rostlin.

Pro odebrání explantátu využíváme jen zdravé rostliny, které nevykazují deficit ve výživě nebo poškození špatným vodním režimem (Smith, 2013).

V principu to znamená, že pro experimenty se mají využívat jen silné rostliny, protože slabé jsou více náchylné k napadení škůdci nebo chorobami (Pierik, 1987).

3.5.1 Explantát

Explantát je odebraná část rostlinné tkáně, která je kultivována v podmínkách *in vitro*. Úspěšnou kultivaci explantátu může ovlivnit mnoho faktorů (Smith, 2013).

3.5.1.1 Roční období

Roční období má velký vliv na kontaminaci a odezvu explantátu. Například očka a prýty odebrané během jara, kdy jsou v růstu, jsou aktivnější než očka v dormanci. Tkáň, která je fyzicky v dormanci obecně neodpovídá v kultivaci *in vitro* a obsahuje mnoho kontaminantů (Smith, 2013).

3.5.1.2 Stáří a zdravotní stav rostliny

Čím starší rostlina je, tím klesá její schopnost regenerace a proto se preferují mladé rostliny a jejich nejmladší části. To samé platí pro zdravotní stav rostliny. Jestliže je rostlina bez napadení chorobami a škůdci bude *in vitro* kultura úspěšná, tedy bez kontaminací (Pierik, 1987).

3.5.1.3 Stáří explantátu

Stáří rostlinného materiálu je velice důležité. Fyziologicky mladší tkáň reaguje lépe v podmínkách *in vitro*. V mnoha případech, fyziologicky starý explantát nezformuje kalus. Mladá tkáň se také lépe povrchově sterilizuje, protože infekce zatím nepronikly hlouběji do rostliny a drží se na povrchu (Smith, 2013).

Pierik (1987) uvádí, že fyziologický stav má veliký vliv na dělení buněk a *in vitro* regeneraci. Například rostliny množené vegetativně reagují lépe než rostliny množené generativně.

3.5.1.4 Velikost explantátu

Velikost explantátu má vliv na odezvu při jeho kultivaci *in vitro*. Obecně platí, čím menší explantát, tím hůře se kultivuje. Větší explantáty obsahují více živin a více růstových regulátorů a to přispívá k udržení kultury (Smith, 2013).

Pokud jsou izolovány velké explantáty, tak živiny (minerály, cukry) obsažené v mediu mají menší efekt (Pierik, 1987).

3.5.1.5 Vhodnost explantátu

Každá část rostliny může být využita ke kultivaci *in vitro*. Záleží, však pro jaké účely explantát odebíráme. Pro namnožení rostlin si vybereme laterární a terminální pupeny nebo výhony. Pro indukci kalusu lze využít hypokotyl. Ovšem excelentní explantáty pro indukci kalusu jsou semenáče z asepticky kultivovaných semen nebo nezralá květenství (Smith, 2013)

Explantáty odebrané z vegetativně množených rostlin regenerují lépe než explantáty z generativně množených rostlin (Pierik, 1987)

3.5.1.6 Pozice explantátu na rostlině

Pozice explantátu na rostlině ovlivňuje jeho následný růst a vývoj v podmínkách *in vitro*. Čím výše, je z rostliny odebrán explantát tím nižší, je šance, že začne tvořit kořeny (Pierik, 1987).

3.5.1.7 Růstové podmínky

Rostliny pěstované ve skleníku jsou více etiolizované a elongované než rostliny pěstované v běžných podmínkách. Materiál odebraný ve skleníku regeneruje lépe než materiál z běžných venkovních podmínek (Pierik, 1987).

3.5.1.8 Řez explantátu

Povrch explantátu nepřijímá nejlépe živiny. Řez na explantátu zvyšuje příjem živin a regulátorů z media, proto by se jím měl explantát dotýkat media (Pierik, 1987).

3.5.2 **Kontaminace**

U některých rostlinných materiálů bývá založení sterilních kultur velmi obtížné. Počáteční proces čištění a desinfekce může být časově velice náročný a nákladný. Při kultivaci *in vitro* může kontaminace pocházet z více zdrojů. Za možné zdroje znečištění můžeme považovat: explantát, osobu, flow box, hmyz, media, nástroje (Smith, 2013).

Hlavním zdrojem kontaminací je explantát. Obsahuje mnoho organismů na povrchu a v malých trhlínkách. Rostliny s epidermálními trichomy zadržují na svém povrchu více kontaminujících organismů než rostliny bez trichomů. Některé rostliny nesou mikroorganismy ve vnitřních pletivech a může být velice obtížné je odstranit (Pierik, 1987).

K minimalizaci zavlečení mikroorganismů přispívá pracovník, který může nést kontaminanty na oblečení a ve vlasech. V neposlední řadě je nutné eliminovat hmyzí přenašeče v laboratoři, hlavně roztoče (Smith, 2013).

3.5.3 **Sterilizace**

Pro úspěšnou kultivaci *in vitro* je nutné eliminovat všechny mikroorganismy. Jelikož všechny patogeny rostou rychleji než rostlinný materiál, proto lze kultivovat jen čistý sterilní rostlinný explantát.

3.5.3.1 Rostlinný materiál

Pierik (1987) uvádí jako nejvhodnější sterilizační činidla:

- Ethanol (C_2H_5OH), který je používán pro sterilizaci rostlinného materiálu v 70% koncentraci, jelikož 96% etanol dehydratuje. Pro sterilizaci pracovních nástrojů se používá 96% etanol, který nezanechá vrstvu vody na povrchu.
- Chlornan sodný ($NaClO$) je nejdostupnější sterilizační činidlo, které lze zakoupit ve většině obchodů jako bělidlo. Využívá se 1 – 2% roztok chlornanu sodného.
- Pro rostliny citlivé k chlornanu sodnému lze využít chlornan vápenatý $Ca(ClO)_2$.
- Chlorid rtuťnatý $HgCl_2$ rozpuštěný ve vodě. Tato velice toxická sloučenina je používána v malých koncentracích 0,01 – 0,05%.

Pro zefektivnění chemické sterilizace je možné využití následných postupů:

- Omývání tekoucí čistou vodou.
- Umístění explantátu před sterilizací do 70% etanolu pro odstranění vzduchových bublin.
- Přidání smáčedla do sterilizační kapaliny sníží povrchové napětí a sterilizační činidlo lépe přilne k povrchu explantátu.

Doba trvání sterilizace se může pohybovat od 5 do 30 minut. Čas sterilizace je individuální. Záleží na druhu rostlinného materiálu a záleží na pracovníkovi, jak dlouho se rozhodne sterilizaci provádět (Pierik, 1987).

3.5.3.2 Media

Obecně se media pro tkáňové kultury autoklávují 15 minut při 121 °C. Tento postup je adekvátní pro nádoby s 10 – 1000 ml tekutého media (Smith, 2013).

3.5.3.3 Nástroje

Běžné nástroje používané pro preparaci explantátů jsou různě velké nůžky, pinzety a skalpely. Před autoklávováním se zabalí do alobalu. Sterilizace v autoklávu probíhá 15 – 20 minut při 121 °C (Smith, 2013).

3.5.3.4 Flow box

Laminární box musí být udržován v naprosté čistotě. Ponechání použitého laboratorního skla, starého rostlinného materiálu a infikovaných medií může způsobit druhotné kontaminace. Před započítím prací se flow box nechá 15 minut běžet se zapnutým UV světlem, poté se pracovní povrch sterilizuje etanolem (Pierik, 1987).

3.5.3.5 Pracovník

Pro minimalizaci zavlečení kontaminace je důležité mytí rukou a nehtů teplou mýdlovou vodou. Před prací ve flow boxu je třeba sterilizovat ruce 70% etanolem. K zavlečení nežádoucích mikroorganismů může dojít z venkovního prostředí, kdy pracovník donese mikroorganismy na svém oděvu či ve vlasech (Smith 2013).

3.6 Příprava asložení media

Živiny jsou nezbytné pro růst a vývoj rostliny. Bez vody a minerálních živin by rostlina *in vitro* nemohla žít. Do media je nutné přidat cukry, protože rostliny (části rostlin) nejsou v těchto podmínkách autotrofické. Důležitost fyzikálních faktorů pro růst a vývoj rostlin je nezbytná jak při normálních podmínkách tak i při *in vitro*. Tyto faktory ovlivňují velké množství procesů v rostlině: vodní režim, evaporace, fotosyntéza, respirace, růst, kvetení, atd.

Čtvrtým důležitým faktorem jsou růstové regulátory, které jsou potřebné jen ve velmi malých koncentracích. Reguluji distribuci látek v rostlině, které jsou zodpovědné za růst a dělení buněk (Pierik, 1987).

3.6.1 Voda

Velká pozornost by měla být věnována vodě, protože tvoří 95% živného media. Pro kultivaci je doporučována dvakrát destilovaná voda. Nelze používat vodu z vodovodu, jelikož obsahuje nežádoucí sloučeniny, které by mohly ovlivnit účinek media (Pierik, 1987).

3.6.2 Agar

Mnoho experimentů se provádí na pevném mediu. Pro tyto účely je hojně využíván právě agar (Smith, 2013).

Agar je polysacharid, který se vyrábí z mořských řas. Používá se jako gelová složka živného media. Při výrobě je vyčištěn, tak že neobsahuje skoro žádné toxické sloučeniny (Pierik, 1987).

3.6.3 Cukr

Je velmi důležitá část každého živného media. Jeho přidání je důležité pro růst a vývoj *in vitro*. Zelené části rostlin nejsou dostatečně autotrofní a nemohou rostlinu zásobovat cukry (Pierik, 1987).

Uhlík obsažený v cukrech nahrazuje rostlinám uhlík, který při běžných podmínkách fixují z atmosféry fotosyntézou (George et al., 2008).

Nejčastěji se využívá sacharóza, ale lze použít fruktózu nebo glukózu. Koncentrace cukrů záleží na typu a stáří rostlinného materiálu (Pierik, 1987).

3.6.4 Minerální složky

Tkáňové kultury a orgány jsou pěstovány *in vitro* na umělých mediích, které je zásobují nezbytnými živinami pro růst. Pro vitální a zdravý růst rostliny potřebují relativně velké množství anorganických prvků (makroprvky):

dusík (N), draslík (K), fosfor (P), vápník (Ca), hořčík (Mg), síra (S).

Malé množství dalších mikroprvků (George et al., 2008):

železo (Fe), nikl (Ni), chlor (Cl), mangan (Mn), zinek (Zn), bor (B), měď (Cu), molybden (Mo).

Po cukrech jsou minerály druhou nejdůležitější složkou media. Na výběr máme z mnoha kombinací solí makro a mikro prvků (Pierik, 1987). Nejpopulárnější je medium MurashigeetSkoog (1962), protože mnoho rostlin na něj dobře reaguje. Výjimkou jsou jen rostliny citlivé na vyšší obsah solí v půdě (Pierik, 1987). Složení media MurashigeetSkoog (1962) je uvedeno v příloze 1.

3.6.5 Rostlinné hormony

Hormony jsou organické sloučeniny syntetizované ve vyšších rostlinách (Procházka, 1998). Mají vliv na růst a vývoj rostlin. Jsou aktivní v různých částech rostliny, kde jsou také produkovány. Na vývoj rostlin působí ve velice malých množstvích. Pro *in vitro* kultury se využívají uměle syntetizované růstové regulátory, které korespondují s rostlinnými hormony (Pierik, 1987).

Dá se říci, že tkáňové kultury vyšších rostlin jsou prakticky nemožné bez růstových regulátorů, jako jsou auxiny a cytokininy (George et al., 2008).

3.6.5.1 Auxiny

Auxiny jsou velmi široce používané regulátory v tkáňových kulturách. Obvykle tvoří základní hormonální složku kultivačního media. V kombinaci s cytokininy podporují růst kalusu, tvorbu rostlinných orgánů a ovlivňují morfogenezi. Samotné auxiny kontrolují základní procesy jako dělení a elongaci buněk. Nejvýraznější účinek je udržování apikální dominance (George et al., 2008).

Při nízké koncentraci auxinů dominuje tvorba náhodných kořenů, ale při vysoké koncentraci nastává tvorba kalusu (Pierik, 1987)

- Kyselina indolyloctová (IAA) patří mezi tzv. „slabé“ regulátory. Je používána ve vyšších koncentracích 0,01 – 10 mg/l.
- Kyselina indolylmásečná (IBA) využívána v koncentracích 0,001 – 10 mg/l.
- Kyselina naftyloctová (NAA) využívána v koncentracích 0,001 – 10 mg/l.

3.6.5.2 Cytokininy

Cytokininy jsou využívány k stimulaci růstu a vývoje. Obvykle podporují dělení buněk, pokud jsou přidány s auxiny. Ve vysokých koncentracích (1 – 10 mg/l) mohou indukovat náhodnou formaci prýtlů. Snižují apikální dormanci a podporují axilární větvení (Pierik, 1987).

3.6.6 Vitamíny

Absence vitamínů v růstovém mediu způsobuje abnormality v růstu a vývoji rostlin, proto je nutné dodat do media směs vitamínů (George et al., 2008).

3.7 Převod z *in vitro* do přirozených podmínek

Rostliny pěstované v podmínkách *in vitro* nemají dobře vyvinutou kutikulu. Relativní vzdušná vlhkost *in vitro* se pohybuje okolo 90 – 100%. Po převedení rostlin do *in vivo*, kde je vzdušná vlhkost nízká, mohou rostliny ztratit značné množství vody. V *in vitro* jsou rostliny autotrofní, ale v podmínkách *in vivo* si musí zajistit příjem sacharidů fotosyntézou. Proto musejí být postupně navykány na přirozené podmínky. Aklimatizace a otužování musí probíhat pomalu, aby se správně vyvinula funkce otvírání a zavírání průduchů na listech. Pierik (1987) doporučuje otužované rostliny vysadit do sterilizovaného media, nejlépe do syntetického, výsadbu přikrýt folií pro udržení vysoké vzdušné vlhkosti, eliminovat patogeny a posupným větráním rostliny přivyknout na přirozené podmínky.

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Pro kultivaci bylo vybráno 6 odrůd druhu *Gerbera jamesonii*.

Tabulka 1 Charakteristika rostlinného materiálu

	barva květenství	velikost květenství	barva středu	produkce za rok (ks/m ²)	délka květního stonku	šlechtitel
Abriana	růžová	10 - 12 cm	černá	300+	65 - 70 cm	Schreus
Ruble	růžová	10 - 13 cm	černá	200 - 250	60 - 70 cm	Schreus
Amparo	oranžová	10 - 12 cm	zelená	250 - 300	60 - 70 cm	Schreus
Black Out	purpurová	9 - 10 cm	černá	200 - 250	60 - 65 cm	Schreus
Bellagio	červená	11 - 13 cm	zelená	250 - 300	60 - 70 cm	Schreus
Adinda	žlutá	10 - 12 cm	černá	300+	60 - 65 cm	Schreus

Jednoleté rostliny poskytl pan Urner, který vlastní stejnojmenné zahradnictví v Praze Krči. Všechny rostliny byly pěstovány hydroponicky v čedičové plsti ve skleníku po dobu pěti měsíců.



Obrázek 1 Zdrojový porost gerber ve skleníku (Macák, 2013)

4.1.1 Explantát

Jako explantát bylo zvoleno nezralé květenství o velikosti 0,5 – 1,0 cm a vrchní část květního stonku. Explantáty odebrané v ranních hodinách byly vloženy do uzavíratelných plastových sáčků a byly uloženy do chladného prostředí. Během dvou hodin se odebraný materiál sterilizoval a kultivoval.

4.1.2 Sterilizace

Před započítím sterilizace se odebrané vzorky částečně mechanicky očistily od svrchních kališních lístků. Poté se oplachovaly proudem studené tekoucí vody z vodovodního řadu po dobu 10 minut. Samotná sterilizace probíhala v uzavřené polypropylenové sterilní zkumavce objemu 50 ml, která obsahovala nezralá poupata se sterilizačním činidlem. Při prvním pokusu byl jako sterilizační činidlo použit 20% roztok chlornanu sodného, při druhém 0,1% roztok chloridu rtuťnatého a při třetím 3,5% roztok chlornanu sodného. Obsah zkumavky byl důkladně 10 minut protřepáván. Po tomto procesu se zkumavka přemístila do flowboxu, kde se poupata vložila do redestilované vody a dvakrát důkladně omyla od zbytků činidla.



Obrázek 2 Zkumavka s činidlem a poupaty (Macák, 2013)

4.2 Medium

Pro kultivaci byly připraveny tři druhy medií, jejichž základem bylo MS medium (MurashigeetSkoog, 1962). Složení MS media je uvedeno v příloze 1.

Tabulka 2 Složení kultivačních medií

Medium*	MS (g/l)	Agar(g/l)	Sacharóza(g/l)	PVP(g/l)	BAP (mg/l)	IAA (mg/l)	NAA (mg/l)
M1	4,4	6,5	25	5	3	0,1	-
M2	4,4	6,5	25	5	5	0,1	-
M3	4,4	6,5	25	5	10	0,1	-
M4	4,4	6,5	25	5	1	0,1	-
MLT 1	4,4	6,5	25	5	1	-	0,1
MLT 2	4,4	6,5	25	5	2	-	0,1
MLT 3	4,4	6,5	25	5	3	-	0,1
MK 1	4,4	6,5	25	5	-	-	0,5
MK 2	4,4	6,5	25	5	-	-	1
MK 3	4,4	6,5	25	5	-	-	2

*M1 – M4 iniciační (kalusotvorné), MLT1 – MLT3 multiplikační, MK1 – MK2 kořenotvorné.

4.2.1 Příprava a sterilizace

Medium bylo připravováno v 1 l kádince. Na přípravu jednoho litru media byla použita redestilovaná voda, 4,4 g MS media (Duchefa), 5g PVP (Duchefa), 6,5 g agaru a 25 g sacharózy. Pro upravení pH na 5,7 bylo použito několik kapek 1M KOH.

Připravené medium bylo rozlito do 100 ml erlenmeyerových baněk po 100 ml. Výsledná media byla sterilizována v autoklávu TuttnauerValuclave 1730 (Německo), po dobu 20 minut při 121°C za tlaku 101,5 kPa. Po sterilizaci byly ve flowboxu Gelaire TC48 (Francie) doplněny růstové regulátory (Sigma, Německo) a rozděleno do petriho misek o průměru 65 mm (6 ml) nebo do 100ml kultivačních sklenic o průměru 5 cm (25 ml).

4.3 Podmínky kultivace

Pro *in vitro* kultivaci gerber byly vytvořeny následující podmínky. V kultivační skříni Sanyo MLR351-H (Sanyo, Japonsko) trval den 16 hodin a 8 hodin noc. Relativní vzdušná vlhkost byla 50% a osvětlení 15000 luxů.

4.4 Postup kultivace

Po provedení sterilizačních postupů se poupě rozdělilo na dvě přibližně stejné části a obě poloviny se vložily do petriho misky tak, aby se řezná plocha dotýkala iniciačního media M. Stonek byl fragmentován na 0,5 cm části a řeznou plochou byl umístěn na kultivační medium. U explantátů, které nezkontaminovaly a vytvořily kalus, byl kalus odebrán rozdělen a přenesen na čerstvé medium, kde se rozrostl. Následně se v kalusu začala vyskytovat primordia. Primordia byla přenesena na multiplikační medium MLT, kde došlo k vytvoření

prvních růžic gerber. Růžice se následně kultivovaly v kořenícím mediu MK, kde vytvořily kompletní rostlinu. Rostlina byla pro zesílení přesazena do MS media bez růstových regulátorů a poté rozdělena na samostatné rostliny, které byly přesazeny samostatně do sklenic. Rostliny s více než 5 listy byly převedeny do nesterilních podmínek, vyjmuty ze sklenice a očištěny od zbytků kultivačního media. Rostliny byly vloženy do uzavíratelné krabičky z průhledného plastu. Jako substrát byl zvolen perlit nebo směs perlit + rašelina v poměru 1 :1. Po otužení byly přesazeny do plastových kontejnerů s čedičovou plstí a napojeny na hydroponickou výživu.

5 Výsledky

5.1 Pokus 1

V tomto pokusu byl použit jako sterilizační činidlo 20% roztok chlornanu sodného. Vysterilizovaná poupata a segmenty stonků byla kultivována nejdříve na čistém MS mediu bez růstových regulátorů. Reagující explantáty byly pasážovány na media M1 – M4.

Z každé z 6 odrůd byly založeny 4 kultivační sklenice s dvěma částmi poupěte a 4 sklenice s dvěma segmenty květního stonku. Celkem bylo kultivováno 48 nádob.

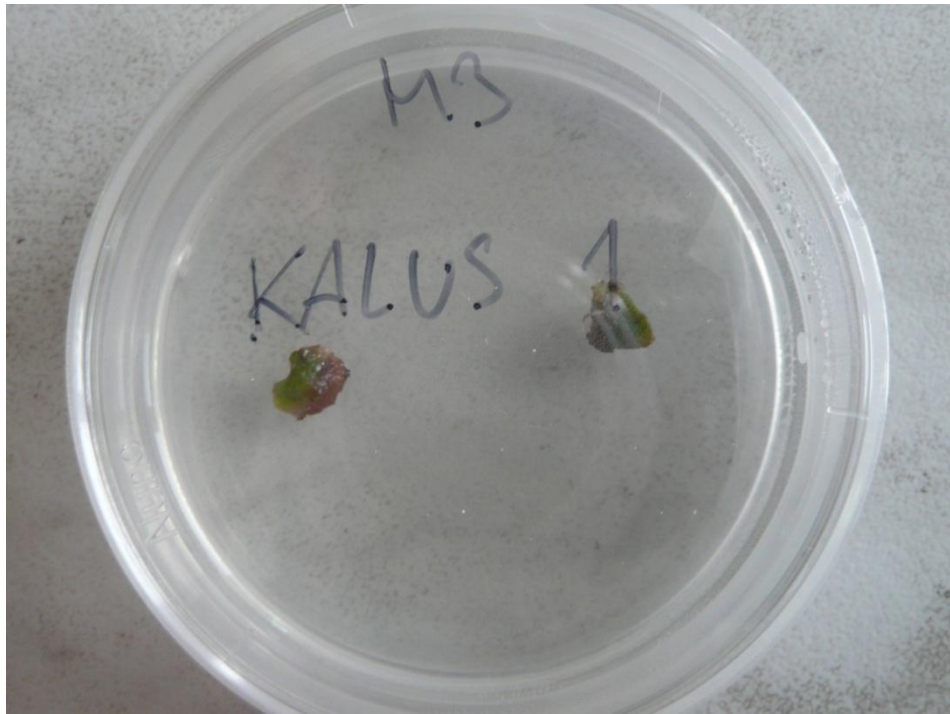
Tabulka 3 Úspěšnost sterilizace v procentech (pokus č. 1)

Explantát	Kontaminace (%)	Zčernání (%)	Přeživší (%)
Poupě (24 ks)	79, 17 (19 ks)	12,5 (3 ks)	8,33 (2 ks)
Stoněk (24 ks)	100 (24 ks)	0	0

Tabulka 4 Vliv koncentrace BAP na tvorbu kalusu a primordií po 30 dnech od založení kultury

Medium	Abriana	Black Out
M1	-	Kalus + Primordia
M2	-	-
M3	Kalus	-
M4	-	-

U odrůdy Abriana vytvořený kalus po odstranění starého poupěte a po následném přesazení nereagoval a po 30 dnech zčernal a uhynul. Postupné odumírání lze vidět na obrázku 3.



Obrázek 3 Abriana poupě M3 (Macák, 2013)

Kalus z odrůdy Black Out po přesazení začal tvořit primordia, ale během 30 dnů postupně odumřel. Základy primordií lze zpozorovat na obrázku 4.



Obrázek 4 Black Out kultivace na mediu M1 po 23 dnech kultivace (Macák, 2013)

5.2 Pokus 2

V tomto pokusu byl použit jako sterilizační činidlo 0,1% roztok chloridu rtuťnatého. Vysterilizovaná poupata byla kultivována nejdříve na mediích M1 – M4. Reagující explantáty byly pasážovány na media MLT1 – MLT3.

Z každé z 6 odrůd bylo založeno 16 petriho misek s dvěma částmi poupěte. Celkem bylo kultivováno 96 poupat.

Z 96 sterilizovaných kusů přežilo 7 kusů (7,29%) a 89 (92, 71%) bylo kontaminováno.

Tabulka 5 Vliv koncentrace BAP na tvorbu kalusu a primordií po 30 dnech od založení kultury

Medium	Abriana	Black Out	Amparo
M1	Úhyn	-	Růst poupěte
M2	1. Růst poupěte, 2. Primordia	-	-
M3	-	-	-
M4	-	-	-

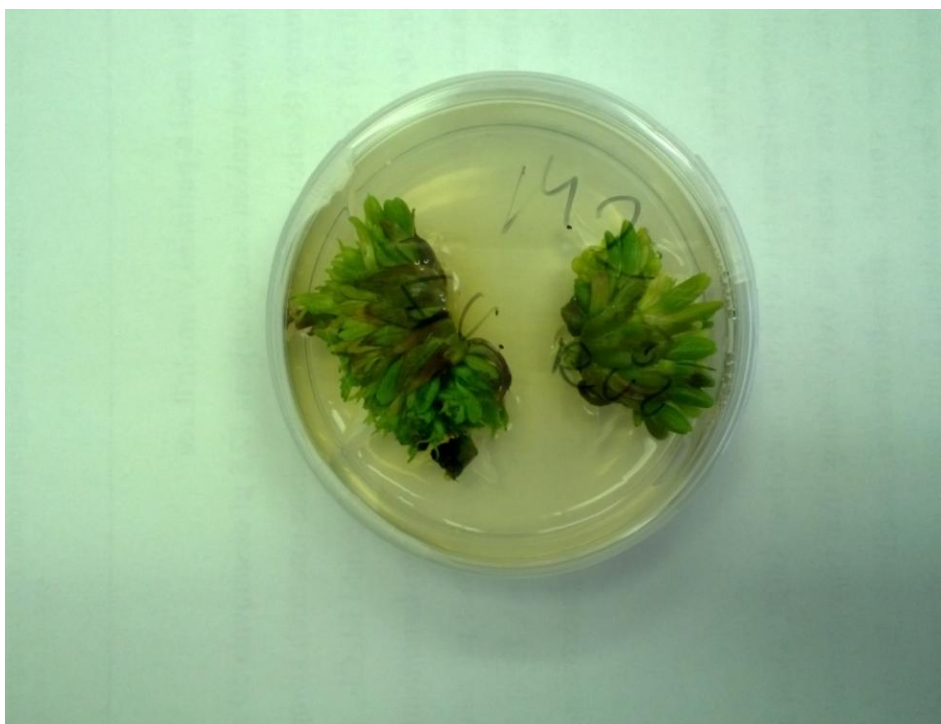
Medium	Ruble	Belagio	Adinda
M1	-	Úhyn	-
M2	-	-	-
M3	-	-	-
M4	1. Úhyn, 2. Úhyn	-	-

Odrůda Abriana kultivovaná na M2 v prvním případě vykazovala tvorbu kalusu a primordií což je viditelné na obrázku 5. Avšak po odstranění starého poupěte a přesazení do multiplikačního media MLT 1 – MLT 3 kalus a primordia uhynula.



Obrázek 5 Abriana - kultivace na mediu M2 po 30 dnech kultivace viditelná primordia (Macák, 2013)

V druhém případě u odrůdy Abriana (světle růžová) kultivované na M2 (MS + 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IA) docházelo pouze k růstu a zvětšování poupěte. Tvorba kalusu nebyla viditelná viz. Obrázek 6.



Obrázek 6 Abriana kultivace na mediu M2 po 30 dnech kultivace růst a zvětšování poupěte (Macák, 2013)

U odrůdy Amparo (oranžová) byly zpozorováno také zvětšování a růst poupěte bez tvorby kalusu viz obrázek 7.



Obrázek 7 Amparokultivace na mediu M1 po 30 dnech kultivace růst a zvětšování poupěte (Macák, 2013)

5.3 Pokus 3

V tomto pokusu byl použit jako sterilizační činidlo 3,5% roztok chlornanu sodného. Vysterylizovaná poupata byla kultivována nejdříve na mediích M1 – M4. Reagující explantáty byly pasážovány na media MLT1 – MLT3.

Z každé z 6 odrůd bylo založeno 16 petriho misek s dvěma částmi poupěte. Celkem bylo kultivováno 96 petriho misek.

Z 96 sterilizovaných kusů přežilo 10 kusů (10,42%) a 86 (89,58%) bylo kontaminováno.

Tabulka 6 Vliv koncentrace BAP na tvorbu kalusu a primordií po 30 dnech od založení kultury

Medium	Abriana	Black Out	Amparo
M1	-	Kalus	-
M2	-	-	-
M3	-	Kalus	-
M4	-	Kalus	-

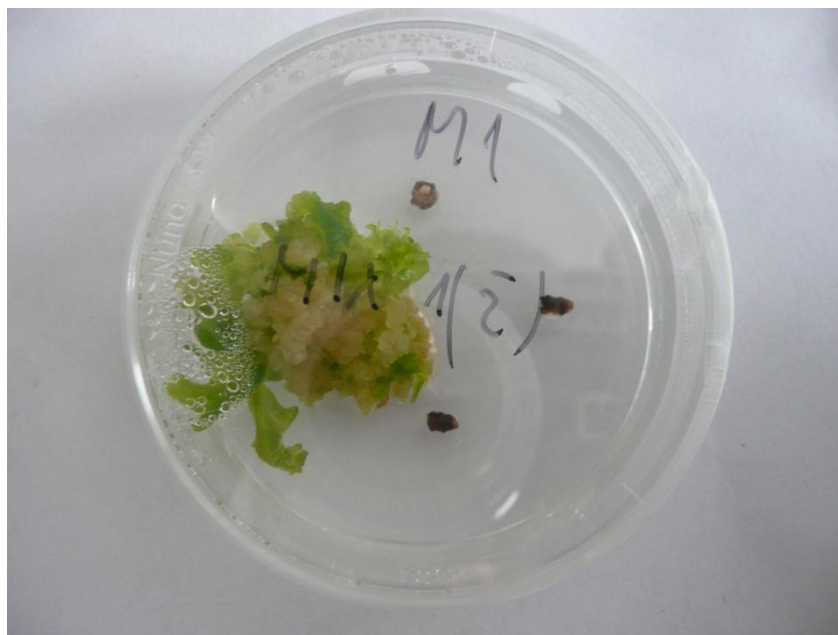
Medium	Ruble	Belagio	Adinda
M1	-	Kalus	Kalus
M2	-	Kalus	-
M3	-	Kalus	Kalus
M4	-	Kalus	Kalus

U pozitivně reagujících kalusů bylo odstraněno staré poupě a následně byly přepasážovány na stejné medium, kde došlo k tvorbě nového kalusu a zakládání primordií. Pro každé medium byly připraveny 4 petriho misky. Tento proces trval 90 dnů. Všechny odrůdy nereagovaly pozitivně a docházelo k značnému úhynu explantátů. Kalus z odrůdy Belagio (červená) uhynul na všech (M1 – M4) mediích. Kalus z odrůdy Adinda (žlutá) přežil jen na mediu M1 (obrázek 8) a kalus z odrůdy Black Out přežil na mediu M3 (obrázek 9).

Tabulka 7 Stav explantátů po 90 dnech

Medium	Abriana	Black Out	Amparo
M1	-	-	-
M2	-	-	-
M3	-	Kalus	-
M4	-	-	-

Medium	Ruble	Belagio	Adinda
M1	-	-	Kalus
M2	-	-	-
M3	-	-	-
M4	-	-	-



Obrázek 8 Kalus odrůda Adinda, medium M1 (Macák, 2013)



Obrázek 9 Kalus odrůda Black Out, medium M3 (Macák, 2013)

Pro multiplikaci byl kalus se základy primordií přesazen na multiplikační media MLT1 – MLT3. Celkem byly od každé odrůdy osazeny 3 petriho misky pro každé multiplikační medium (tabulka 8). U odrůdy Adinda (žlutá) byl pozorován nový růst primordií u všech třech medií, ale nedocházelo k vytvoření základních růžic rostliny a nově vytvořené listy byly „skelné“ (obrázek 10) a postupně uhynuly. Přežily jen na mediu MLT3. Oproti tomu odrůda Black Out (purpurová) tvořila růžice listů typické pro gerbery. Reagovala

pozitivně na všechna multiplikační media (Obrázek 11). Celkem byly získány 3 základní růžice jedna od každého media MLT (Tabulka 9).

Tabulka 8 Počty kalusů pro jednotlivá media

Medium	Adinda	Black Out
MLT 1	3	3
MLT 2	3	3
MLT 3	3	3

Tabulka 9 Získané růžice

Medium	Adinda	Black Out
MLT 1	0	1
MLT 2	0	1
MLT 3	0	1



Obrázek 10 Adinda, skelné listy, stav po 48 dnech od přesazení na MLT3 medium (Macák, 2013)



Obrázek 13 Black out po 90 dnech na MK3 a po 40 dnech na MS mediu (Macák, 2014)

Tři matečné rostliny byly rozděleny na 12 rostlin, které byly samostatně kultivovány 40 dní ve 100ml sklenicích na MS mediu. Před vysazením do skleníku byly postupně přivykány na nižší vzdušnou vlhkost. Šest rostlin bylo přesazeno do substrátu, který se skládal z 50% z perlitu a z 50% z rašeliny. Zbýlých 6 rostlin bylo otužováno v čistém perlitu. Nedošlo k úhynu ani jedné z rostlin. Po otužení byly rostliny vysazeny do čedičové plsti a hydroponicky dopěstovány do produkční velikosti (obrázek 14).



Obrázek 14 Black Out po 100 dnech od vysazení do čedičové plsti (Macák, 2014)

6 Statistické zhodnocení dat

Získaná data byla hodnocena v programu MS Office Excel 2007. Zjištěné četnosti kontaminovaných, nekontaminovaných reagujících a nekontaminovaných nereagujících explantátů byly porovnány s očekávanými četnostmi pomocí chí testu.

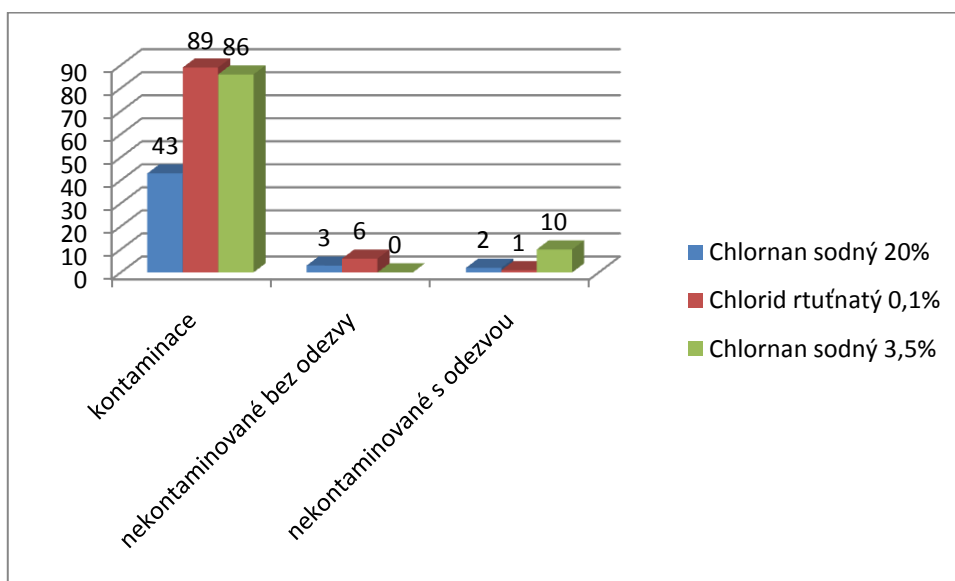
Taktěž chí testem byla testována životaschopnost kalusu na mediích M1 – M4 u odrůd Adinda, Bellagio a Black Out.

Ve fázi multiplikace byly porovnávány četnosti reagujících explantátů na MLT media s očekávanými četnostmi taktěž pomocí chí testu.

Při výpočtech a interpretaci výsledků testování byla použita hladina významnosti 0,05.

6.1 Sterilizace

Zjištěné četnosti (příloha 2) kontaminovaných a nekontaminovaných explantátů jsou zobrazeny v grafu (obrázek 15).

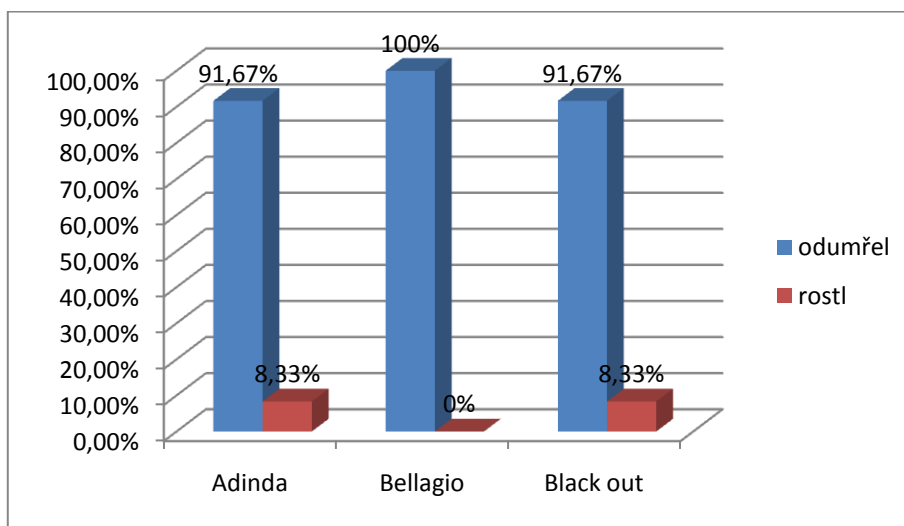


Obrázek 15 Četnosti explantátů pro sterilizaci

Výsledná p-hodnota chí testu byla 0,01. Tato hodnota je nižší než zvolená hladina významnosti 0,05, proto zamítáme nulovou hypotézu. S 95% pravděpodobností můžeme konstatovat, že sterilizační činidlo má vliv na životaschopnost kultivovaného materiálu.

6.2 Životaschopnost kalusu

Životaschopnost kalusu na mediích M1 – M4 bylo možné testovat jen u odrůd Adinda, Bellagio a Black Out. Důvodem bylo vysoké procento kontaminovaných explantátů po sterilizaci. U jednotlivých odrůd bylo zjišťováno, zda jejich genotyp má vliv na indukci kalusu. Nebyla rozlišována jednotlivá media M1 – M4. Zjištěné četnosti jsou zobrazeny v grafu (obrázek 16).



Obrázek 16 Četnost reagujících a nereagujících kalusů na media M1 – M4 podle odrůd

Výsledek chí testu pro četnosti reagujících explantátů na iniciaci byl 0,70. Výsledná hodnota převyšovala hladinu významnosti 0,05, což znamená, že část druhé hypotézy není potvrzena a genotyp rostliny nemá vliv na růst kalusu.

6.3 Multiplikace

Postupné umírání kalusů zapříčinilo, že responsivita explantátu byla nakonec zjišťována jen u dvou odrůd, Adinda a Black Out. Chí test nebylo možné použít pro zjištění vlivu medií MLT1 – MLT3 na multiplikaci prýtů.

7 Diskuse

V první části diskuse bych se rád zaměřil na vliv sterilizačního činidla na životaschopnost kultivovaného materiálu. Na tuto část pokusu byl kladen největší důraz, protože od její úspěšnosti se odvíjejí další kroky kultivace.

Z naměřených dat lze vyčíst, že jako nejvhodnější sterilizační činidlo se jeví 3,5% roztok chlornanu sodného, což potvrzuje i chí test shody četností kontaminovaných explantátů. Při jeho použití bylo životaschopných 10,42% explantátů.

Výsledky u 0,1% roztoku chloridu rtuťnatého jsou jen o málo nižší a to 7,29%. Pokud ale porovnáme druhou fázi – iniciaci tvorby kalusu v prvním a druhém pokusu, jsou zde viditelné rozdíly. Chlorid rtuťnatý sice explantáty vysterilizoval, ale patrně ovlivnil i další životaschopnost materiálu, který následně nereagoval na iniciační media a zčernal. Velkou roli v tomto případě hraje rtuť, která je toxická zároveň pro mikroorganismy i pro rostliny (Pierik, 1987). Chlorid rtuťnatý je velice nebezpečná toxická sloučenina pro lidský organismus a Smith (2013) doporučuje vyhýbat se sterilizaci tímto činidlem. Dále Smith (2013) zdůrazňuje, že 0,2% roztok chloridu rtuťnatého má stejné sterilizační účinky jako 33 % roztok chlornanu sodného a chlornan má lepší výsledky ve vývinu prýtů.

20% roztok chlornanu sodného vysterilizoval 4,17% explantátů. V iniciační fázi byl výsledek téměř nulový. Přežily jen dva explantáty, které vytvořily kalus. Můžeme usoudit, že zvýšená koncentrace chlornanu sodného v roztoku taktéž působí negativně. Což také potvrzuje Pierik (1987), který doporučuje 1-2% roztok chlornanu sodného. Předmětem dalšího zkoumání, proto může být sterilizace materiálu roztokem chlornanu sodného o nižších koncentracích nebo silnějším roztokem po kratší dobu.

Iniciace tvorby kalusu byla značně ovlivněna kontaminacemi. Z dosažených výsledků nelze přesně říci, zda indukci kalusu více ovlivňuje genotyp nebo koncentrace růstových regulátorů v mediích M1 – M4. V pokusu č. 3 bylo zjištěno, že kalus z odrůdy Adinda přežil a rostl celkem 120 dní na mediu M1 (3mg/l BAP + 0,1mg/l IAA). Ve stejném pokusu se dařilo přežít a růst 120 dní kalusu z odrůdy Black Out na mediu M3 (10mg/l BAP + 0,1mg/l IAA). U jiných odrůd se kalus buď vůbec nevytvořil anebo uhynul po odstranění starého poupěte, které proběhlo po 30 dnech kultivace. Akter et al. (2012) uvádí, že věk květního pupenu je důležitý faktor v indukci kalusu. U všech testovaných variant (červená, žlutá a bílá) je zřejmé, že 7 – 9 dní staré květní pupeny tvoří kalus z 80 – 90%. Kdežto u 10 a 11 denních květních

pupenů je úspěšnost pouze 45 – 65%. Avšak Akter et al. (2012) používají pro iniciaci kalusu medium s 1 – 6 mg/l BAP a 0,5 – 1 mg/l NAA oproti této práci, která využívá 1 – 10 mg/l BAP a 0,1 mg/l IAA. Zde se nabízí prostor pro zkoumání vlivu stáří květního pupenu na tvorbu kalusu.

Ve fázi multiplikace a tvorby nových prýtů na multiplikačních mediích MLT1 – MLT3 byla ověřována hypotéza, zda genotyp a koncentrace růstových hormonů má vliv na multiplikaci prýtů. Po 48 dnech kultivace na mediích MLT1 – MLT3 docházelo u odrůd Adinda i Black Out k multiplikaci. Avšak u odrůdy Adinda se tvořily jen náhodné skelné listy, kdežto u odrůdy Black Out se zakládaly listové růžice typické pro gerbery. Chí test provedený pro četnosti přeživších růžic nepotvrdil, že genotyp má vliv na multiplikaci prýtů. Celkem byly získány 3 listové růžice z odrůdy Black Out. Pro malý počet přeživší explantátů nebylo možné testovat vliv růstových regulátorů obsažený v mediích na multiplikaci prýtů. Ovšem zvolenými druhy regulátorů (BAP a NAA) byly dosahovány vynikající výsledky v práci Naz et al. (2012), kde byly zvoleny vyšší koncentrace 4 – 8,68 mg/l BAP a 1,5 – 2,68 mg/l NAA. Multiplikace byla pozorována v 50 – 75% případů. U media doplněného jen o 10 mg/l BAP byla odezva na multiplikaci 90%. Další testování medií vhodných pro multiplikaci by mělo ubírat tímto směrem. Tedy navýšit koncentrace růstových hormonů a také vyzkoušet pro multiplikaci jen samotné BAP ve vyšších koncentracích (6 – 10 mg/l).

Pro tvorbu kořenů byla použita media MK1-MK3. Odrůda Adinda neměla vytvořené základní růžice listů a nejspíše z tohoto důvodu nezakořenila. Toto potvrzuje práce Naz et al. (2012), kde se uvádí, že nejlépe kořenily gerbery, které měly listy 5 cm dlouhé. Odrůda Black Out vytvořila v multiplikačním mediu 3 základní listové růžice, které na mediích MK1 – MK3 zakořenily. Z těchto výsledků nelze přesně říci, zda má genotyp a koncentrace růstových regulátorů vliv na tvorbu kořenů. V dostupné literatuře (Nguyen, 2007; Aswath, 2002; Naz et al. 2012) nikdo neuvádí, že genotyp má vliv na tvorbu kořenů. Druh růstových hormonů (NAA) pro kořenění nebyl zvolen špatně. Se stejnými koncentracemi 0,5 – 2,0 mg/l dosahuje Nguyen (2007) velmi příznivých výsledků. Jeho práce informuje, že při koncentraci 2 mg/l zakořenilo až 90% listových růžic. Akter et al. (2012) uvádí, že nízké koncentrace NAA (0,1 – 0,2 mg/l) začnou u rostlin znovu indukovat tvorbu kalusu bez formace kořenů. Ten samý autor dosahuje nejlepších výsledků s 0,2 mg/l IBA.

Po zakořenění a rozdělení matečních rostlin na 12 životaschopných jedinců byly zvoleny jen 2 substráty pro převod do *in vivopodmínek*. V čistém perlitu přežilo všech 6 rostlin a v perlitu s rašelinou v poměru 1 :1 přežilo taktéž všech 6 rostlin. Tedy 100% úspěšnost u obou medií. Nguyen (2007) dosahuje nejlepších výsledků (67 %) u čistého vermikulitu a nejnižších u písku s kokosovou drtí v poměru 1 : 1 a to jen 27 %. Naz et al. (2012) uvádí jako nejlepší substrát pro otužení autoklávovaný písek avšak neuvádí, jak si procentuálně vede oproti kompostu, kokosové drti a neautoklávovanému písku.

8 Závěr

Hypotéza 1, že sterilizační činidlo má vliv na životaschopnost kultivovaného materiálu, byla potvrzena. Lze to prokázat statistickým zhodnocením přeživších explantátů v jednotlivých pokusech pomocí chí testu.

U hypotézy 2 nelze s přesností říci, zda byla potvrzena či vyvrácena, protože množství testovaného materiálu bylo značně ovlivněné kontaminací a proto nemohly být statisticky prozkoumány vlivy všech genotypů a koncentrací hormonů na organogenezi *in vitro*.

- Indukce kalusu: Neprokázano, nevyvráceno (vliv kontaminace).
- Tvorba primordií a prýtů: Odrůda Adinda netvořila na mediích MLT1 – MLT3 listové růžice. Oproti tomu odrůda Black Out vytvořila růžice. Provedený chí test nepotvrdil vliv genotypu na tvorbu a multiplikaci primordií.
- Tvorba kořenů: Neprokázano, nevyvráceno. Pro objektivní zhodnocení nepřežil dostatečný počet rostlin. Zakořenily jen 3 rostliny, které byly rozděleny na 12 rostlin pro otužení.

U hypotézy 3 byl taktéž problém s objektivním zhodnocením, jelikož bylo otužováno jen 12 rostlin. Z těchto výsledků lze říci, že oba testované substráty (perlit a perlit+rašelina 50:50) nemají negativní vliv na životaschopnost rostlin, protože všech 12 rostlin přežilo.

9 Seznam literatury

Akter, N., Hoque, M. I., Sarker, R. H. 2012. *In vitro* Propagation in Three Varieties of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus.) from Flower Bud and Flower Stalk Explants. *Plant Tissue Cultures & Biotechnology*. 22(2). 143-152.

Aswath, C. R., Choudhary, M., L. 2002. Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. Indian Institute of Horticultural Research. p. 125 – 134. ISSN: 0365-0588.

Atanasova, H. 2001. *Zahradnický slovník naučný*. 1. vyd., Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2001. 674 s. ISBN: 80-7271-075-3.

Davey, M. R., Anthony, P. 2010. *Plant Cell Culture*. Wiley-Blackwell. Loughborough. p. 358. ISBN: 978-0-470-68648-5.

Dhal, N. K., Sahu, S. C. 2012. *Plant Science*. Intech. Rijeka. p. 314. ISBN: 978-953-51-0905-1.

George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. Dordrecht. p. 501. ISBN: 978-1-4020-5005-3.

Hussein, G. M., Ismail, I. A., Hashem, M. E. S., Miniawy S. M. E., Abdallah, N. A. 2008. *In vitro* regeneration of gerbera. *Agriculture and Forestry Research*. 58 (1/2). 97-102.

Kumar, S., Kanwar, J. K. 2006. Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. *Folia horticultrae*. 18 (2). 57-64.

Naz, S., Naz, F., Tariq, A., Aslam, F., Ali, A., Athar, M. 2012. Effect of different explants on *in vitro* propagation of gerbera (*Gerbera jamesonii*). *African Journal of Biotechnology*. 11 (37). 9048-9053.

Nguyen, V. S. 2007. Response of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) Varieties to Micropropagation. University of Agricultural Sciences. Dharwad.

Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. p. 344. ISBN: 9024735300.

Pokluda, R., Kobza, F. Skleníky, foliovníky, využití a pěstební technologie. 1. vyd., Praha: ProfiPress, 2011. 253 s. ISBN 978-8086726-46-5.

Procházka, S., Krekule, J., Macháčková, I., Šebánek, J. Fyziologie rostlin. 1. vyd., Praha: Academia, 1998. 484 s. ISBN: 80-200-0586-2.

Shabbir, K., Ahmad, T., Hafiz, I. A., Hussain, A., Abbasi, N. A. Ahmad, J. 2012. *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* cv. Sunglow. African Journal of Biotechnology. 11 (42). 9975-9984.

Smith, R. H. 2013. Plant Tissue Culture. Elsevier. San Diego. p. 188. ISBN: 978-0-12-415920-4.

Tyagy, P., Kothari, S. L. (2004). Rapid *in vitro* regeneration in *Gerbera jamesonii* (H. Bolus ex Hook. f.) from different explants. Indian Journal of Biotechnology. 3 (4). 584-588.

Volf, M., Votruba, R. Základy skleníkového hospodářství. 1. vyd., Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda, 1991. 160 s. ISBN: 80-209-0201-5.

Votruba, R. Skleníkové květiny k řezu. 1. vyd., Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. 238 s. ISBN: 07-116-80-04/45.

Vít, J., Nachlingerová, V., Pinc, M., Tvrzník, Č., Šedivá, J. Květinářství. 3. vyd., Praha: Květ, 2001. 439 s. ISBN 80-85362-41-4.

10 Samostatné přílohy

Makroelementy	mg/l	Mikroelementy	mg/l	Vitamíny	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0,83	thiamin (B1)	10
KNO ₃	1900	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	pyridoxin (B6)	11
H ₃ BO ₃	6,2	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	Kyselina nikotinová	1
KH ₂ PO ₄	170	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	glycin	1
MgSO ₄	180,54	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	myo-inositol	100
CaCl ₂	332,02	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025		
		NAa ₂ EDTA	36,7		

Příloha 1 Složení Murashige and Skoog media (1962)

skutečné četnosti			
	kontaminace	nekontaminace	s odezvou
Chlornan sodný 20%	43	3	2
Chlorid rtuťnatý 0,1%	89	6	1
Chlornan sodný 3,5%	86	0	10
očekávané četnosti			
	kontaminace	nekontaminace	s odezvou
Chlornan sodný 20%	43,6	1,8	2,6
Chlorid rtuťnatý 0,1%	87,2	3,6	5,2
Chlornan sodný 3,5%	87,2	3,6	5,2
Signifikance chí kvadrát testu			0,00722054

Příloha 2 Četnosti explantátů po sterilizaci

Seznam příloh

Příloha 1 Složení Murashige and Skoog media (1962)

Příloha 2 Četnosti explantátů po sterilizaci