

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra botaniky a fyziologie rostlin

**Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů vybraných genotypů
česneku setého ve vztahu k regeneraci po kryoprezervaci.**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Renata Kotková

Školitel: Doc. Ing. Václav Hejnák, Ph.D.

**Konzultant: Ing. Jiří Zámečník, CSc., Výzkumný ústav
rostlinné výroby v.v.i, Praha – Ruzyně**

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma **Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů vybraných genotypů česneku setého ve vztahu k regeneraci po kryoprezervaci** vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Václavu Hejníkovi, Ph.D., za věcné připomínky a pomoc během celého doktorského studia. Dále bych velice ráda poděkovala Ing. Jiřímu Zámečnickovi, CSc., za odborné vedení v průběhu doktorského studia, za cenné rady a za odbornou pomoc při zpracování doktorské práce. Děkuji členům katedry botaniky a fyziologie rostlin za cenné připomínky a všestrannou pomoc. Rovněž bych velmi ráda poděkovala a celému kolektivu zaměstnanců z Oddělení molekulární biologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i., Praha – Ruzyně, za velmi přátelské a motivační prostředí v průběhu řešení mé doktorské práce.

Tato práce byla podpořena projektem OC08062, poskytnutý Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR, výzkumnými záměry MZe0002700604 a MZe0002700602 Ministerstva zemědělství ČR, mezinárodním projektem GENRES EURALLIVEG a interním školním grantem FAPPZ GA 21110/1312/3111.

Souhrn

Základní charakteristiky růstu rostlin česneku (*Allium sativum* L.) v *in vitro* podmínkách byly studovány pro stanovení optimalizace růstu těchto rostlin. Byla stanovena relativní rychlost růstu rostlin v časovém horizontu šesti týdnů, vzestupná tvorba sušiny, obsah fotosyntetických pigmentů chlorofylů a a b, růstové charakteristiky z pohledu nárůstu čistého výkonu asimilace, snížení relativní rychlosti růstu asimilační plochy a poklesu integrální listové plochy. Dále se tato práce zabývá působením rozdílné teploty na růst rostlin (5 a 20 °C) a vlivem složení kultivačního média z pohledu obsahu sacharózy (0-15-30-60-120 g l⁻¹), optimální podmínky pro růst rostlin *Allium sativum* byly stanoveny při teplotě 20 °C a 15 g l⁻¹ sacharózy v kultivačním médiu.

Multiplikace rostlin byla studována z důvodu zvýšení počtu rostlin po kryoprezervaci. Účinek dvou regulátorů růstu (NAA a BAP) s různými koncentracemi byl studován na vzrostných vrcholech česneku. Nejlepší kombinace koncentrace regulátorů růstu pro multiplikaci rostlin byla 0,5 mg l⁻¹ NAA a 1,0 mg l⁻¹ BAP, druhé multiplikační maximum se nacházelo při aplikaci 3,0 mg l⁻¹ NAA a 0,3 mg l⁻¹ BAP.

Stanovení obsahu vody při porovnání rostlin s normálním růstem bez jakýchkoliv fyziologických změn a hyperhydratovaných rostlin, které měly skelný vzhled pletiv, byly ztloustlé, zkrácené, průhledné, vodnaté a omezené v růstu. Hyperhydratované rostliny měly prokazatelně vyšší relativní obsah vody a celkový obsah vody, naproti tomu vodní sytostní deficit byl velmi nízký. Hyperhydratované rostliny byly schopné látkové výměny, ale často nebyly vitální, měly malformované listy a stonky, průsvitná, ztloustlá a vodnatá pletiva.

Monitoringem fotosyntetických pigmentů (chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy) byly porovnány hyperhydratované rostliny a rostliny, které byly bez morfologických změn. Hyperhydratované rostliny vykazovaly snížení obsahu pigmentů v rostlinách pravděpodobně v důsledku větší změny v metabolismu.

Zvýšení koncentrace vitrifikačního roztoku působícího na vzrostné vrcholy česneku v určitém časovém intervalu mělo za následek snížení obsahu vody a snížení procentického podílu krystalické vody. Podíl krystalické vody se postupně snižoval se zvyšující se koncentrací PVS roztoku a doby expozice. V této práci byl studován vliv kryoprotektivních látek různé koncentrace (PVS3 30/30; 35/35; 40/40; 45/45; 50/50 w/v % sacharóza/glycerol) na vzrostné vrcholy česneku po dobu 30–210 minut, kdy došlo k postupné dehydrataci pletiv. Poté byly vzrostné vrcholy zamrazeny rychlým ponořením do tekutého dusíku, po rozmrazení se sledovala jejich regenerační schopnost. Byla odvozena optimální koncentrace

kryoprotektivního roztoku PVS3 50/50 w/v % sacharóza/glycerol a jeho doba působení (120 minut) na vzrostné vrcholy *Allium sativum*.

V této práci byla úpravou vnějších podmínek kultivace rostlin česneku stanovena optimální kultivační teplota (20 °C) a byl upraven obsah sacharózy v kultivačním médiu (15 g l⁻¹), které vedly ke zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci. Byla nalezena optimální teplota pro skladování pacibulek česneku (4 °C), která nesnižuje jejich vitalitu neovlivňuje úroveň regenerace po kryoprezervaci. Růstovou analýzou byl zjištěn limit zdrojů pro růst rostlin česneku *in vitro* podmínkách po 6 týdnech kultivace. Dále byl zvýšen multiplikační koeficient těchto rostlin metodou mechanické stimulace (3 rostliny/měsíc) a pomocí růstových regulátorů (12 rostlin/měsíc), který je nutný pro dosažení počtu rostlin pro kryoprezervaci. U hyperhydratovaných rostlin byl potvrzen vysoký obsah vody v pletivech a snížený obsah chlorofylů a a b. Optimalizací kryoprotektivního roztoku (PVS3 50/50 w/v % sacharóza/glycerol, po dobu 120 min) bylo dosaženo vyšší úrovně regenerace rostlin po kryoprezervaci, tyto výsledky byly potvrzeny kalorimetrickým měřením pomocí DSC.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Vnější a vnitřní podmínky působící na fyziologické vlastnosti <i>Allium sativum</i>	8
2.1.1	Růstové charakteristiky česneku	9
2.1.2	Explantátové kultury	11
2.1.3	Osmotický stres rostlin.....	11
2.2	Kvantifikace fyziologických vlastností	13
2.2.1	Analýza obrazu.....	14
2.2.2	Regulátory rostlinného růstu	15
2.2.3	Dehydratace rostlinných pletiv.....	17
2.3	Složení a koncentrace kryoprotektivních látek	20
2.3.1	Kryoprotektivní látky	21
2.3.2	Kryoprezervace rostlinného materiálu	29
2.3.3	Metody kryoprezervace	32
2.3.4	Metody termické analýzy	36
3	Cíl práce a vědecké hypotézy.....	39
4	Materiál a metody.....	40
4.1	Rostlinný materiál	40
4.1.1	Příprava rostlinného materiálu a kultivačního média.....	45
4.2	Metodika.....	45
4.2.1	Vliv podmínek působících na fyziologické vlastnosti <i>Allium sativum</i>	45
4.2.2	Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů	49
4.2.3	Optimalizace složení a koncentrace kryoprotektivních látek.....	51
4.3	Hodnocení naměřených hodnot.....	56
5	Výsledky a diskuze.....	57
5.1	Charakteristika růstu česneku v in vitro podmínkách	57
5.1.1	Vliv teploty na rychlost růstu	60
5.1.2	Vliv sacharózy v médiu na růst rostlin.....	61
5.1.3	Odolnost rostlin <i>Allium sativum</i> vůči mrazu	63
5.1.4	Délka dormance pacibulek rostlin.....	66
5.2	Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů	75

5.2.1	Růstové charakteristiky	75
5.2.2	Zvýšení multiplikačního koeficientu rostlin.....	78
5.2.3	Hyperhydratace, obsah vody a obsah chlorofylů	81
5.3	Optimalizace složení a koncentrace kryoprotektivních látek.....	86
5.3.1	Kryoprezervace vzrostných vrcholů česneku.....	86
5.3.2	Termická analýza	88
6	Závěry a doporučení pro využití poznatků v praxi	99
6.1	Doporučení pro využití poznatků v praxi.....	100
7	Seznam literatury.....	102

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
2-iP	2-isopentyladenin
BAP	6-benzylaminopurin
BSA	albumin z hovězího séra
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenční skenování kalorimetr (z angl. Differential Scanning Calorimeter)
EG	ethylenglykol
ELISA	imunologická metoda pro detekci specifických protilátek a antigenů (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay)
EVIGEZ	dokumentační systém genetických zdrojů rostlin, EVidence GENetických Zdrojů rostlin
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FBW	mrznoucí vázaná voda (z angl. Freezing Bound Water) (Bellich <i>et al.</i> , 2009)
FFW	mrznoucí volně vázaná voda (z angl. Freely-Freezing Water) (Bellich <i>et al.</i> , 2009)
GB	glycinebetain
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
IGB	genová banka v Izraeli (z angl. Israeli Gene Bank)
IPGRI	Mezinárodní instituce genetických zdrojů rostlin (z angl. International Plant Genetic Resources Institute)
LD ₅₀	střední smrtná dávka z lat. <i>dosis letalis media</i>
LN	tekutý dusík (z angl. Liquid Nitrogen)
LT ₅₀	letální teplota (z angl. Lethal Temperature)
MEL	výtok elektrolytu (z angl. Meristem Electrolyte Leakage)
MS	růstové médium podle Murashige a Skoog (Murashige a Skoog, 1962)
NAA	kyselina α -naftyloctová
NADH + H ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NFW	nemrznoucí voda (z angl. Non-Freezing Water) (Bellich <i>et al.</i> , 2009)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PEG	polyethylenglykol
PG	propylen glykol

Pro	prolin
PVP	polyvinylpyrolidin
PVS	vitřifikační roztok pro rostliny (z angl. Plant Vitrification Solution)
PVSL	vitřifikační roztok (z angl. Plant Vitrification Solution Liu) (Liu <i>et al.</i> , 2004b)
QITMDSC	kvazi-izotermická TMDSC (z angl. Quasi-Isothermal TMDSC)
RMM	relativní molekulová hmotnost (z angl. Relative Molecular Mass)
SH	specifická hmotnost při 20 °C (voda = 1)
T _g	teplota skelného přechodu (z angl. Glass Transition Temperature)
T _m	rovnovážný bod tání
TMDSC	teplota modulovaného DSC (z angl. Temperature Modulated DSC)
TTC	trifenyltetrazoliumchlorid, pro biochemické testy
VS	vitřifikační roztok (z angl. Vitrification Solution)
VSL	vitřifikační roztok (z angl. Vitrification Solution L) (Suzuki <i>et al.</i> , 2008)

1 Úvod

Konzervace a uchovávání genetického materiálu jsou velmi důležité pro využití rostlin nejen jako zdroje potravy, ale i léčivých nebo planě rostoucích rostlin a rovněž pro uchování vzácných a ohrožených druhů. Uchování rostlinného materiálu může být provedeno v podmínkách *in situ* (uchování určité populace v místě jejího výskytu) nebo *ex situ* (hospodářsky významné druhy). V současnosti se využívají pro uchování rostlin spíše metody uchování mimo původní místo výskytu, v genových bankách. Genové banky poskytují možnost rozšiřování, hodnocení, dokumentace, uchování a využití genetických zdrojů více rostlinných druhů z různých oblastí světa z jednoho místa. Jeden ze způsobů jak uchovat rostliny je jejich pěstování v *in vitro* podmínkách. Ani tento způsob není zcela bez úskalí. Dlouhodobou kultivací a opakovaným pasážováním explantátových kultur v *in vitro* podmínkách, může docházet ke genetické nestabilitě, ztrátě morfogenetického potenciálu a poklesu jejich biosyntetické aktivity, což může mít negativní vliv na udržení stability genotypu rostlin. Vhodnou metodou pro uchování genetického materiálu vegetativně množených rostlin se jeví metoda kryoprezervace. Kryoprezervace je metoda dlouhodobého uchování živého materiálu v podmínkách ultra-nízkých teplot tekutého dusíku (-196 °C). Zamrazování rostlinného materiálu je stále ve fázi hledání vhodných postupů a optimalizace kryoprezervačních metod. Fyziologické procesy, které probíhají v rostlinných pletivech po celou dobu předkultivace, samotného zamrazení a následného tání, přežití, regenerace a pěstování rostlin po kryoprezervaci, nejsou stále dostatečně prostudovány.

Rostliny odolné vůči nízkým kladným teplotám mohou být poškozeny mrznutím vody v pletivech, tj. tvořením ledu v extracelulárních prostorech a mezi buněčnou stěnou a cytoplazmou; pokud se uvnitř buňky vytvoří krystaly ledu, buňka zahyne (Volk *et al.*, 2004b). K prevenci poškození buněk ledovými krystaly slouží kryoprotektivní roztoky, které pronikají do buněk a dehydratují je, čímž dochází ke stabilizaci proteinů a membrán (Kim *et al.*, 2006a). Kryoprotektivní látky použité v našich experimentech – glycerol a sacharóza – jsou méně toxické než ostatní běžně používané kryoprotektanty jako např. dimethylsulfoxid, propylenglykol, ethylenglykol (Kobayashi *et al.*, 2005).

Otázka použití optimální koncentrace a doby působení kryoprotektivních látek není zcela vyřešena. Právě používání různých koncentrací kryoprotektivních roztoků při kryoprezervaci rostlin může ovlivnit jejich přežití a regeneraci. Často se na zamrazování

vzrostných vrcholů česneku používají vitrifikační protokoly (Langis a Steponkus, 1990; Sakai *et al.*, 1991). Poměrně často používané složení vitrifikačních roztoků obsahuje 50 % sacharózy (w/v) a 50 % glycerolu (w/v) a je označeno PVS3 (Benson, 2008; Kim *et al.*, 2006b; Volk *et al.*, 2006). Jiný, úspěšně používaný vitrifikační roztok obsahuje kryoprotektivní látky o složení 40/40 % sacharóza/glycerol (w/v) (Reed, 2008; Sakai a Engelmann, 2007). Při kryoprezervaci jabloní je s úspěchem používáno složení vitrifikačního roztoku 50/30 % sacharóza/glycerol (w/v) (Halmagyi *et al.*, 2010).

Kromě složení vitrifikačních roztoků má velký vliv na jejich účinek i doba působení kryoprotektivních látek, a to i při použití v rámci jediného rostlinného druhu. Např. u vzrostných vrcholů česneku používají Kim *et al.* (2004a) a Volk *et al.* (2006) roztok PVS3 50/50 % sacharóza/glycerol (w/v) po dobu 150 minut. Naproti tomu jiní autoři Makowska *et al.* (1999), Keller (2005) a Ellis *et al.* (2006) používají tentýž roztok po dobu 120 minut.

Pro stanovení množství krystalické vody a vzniku možného poškození rostlinného materiálu je možné využít termickou analýzu s využitím diferenčního skenovacího kalorimetru. Pomocí této metody lze zjistit počáteční teplotu, při které dochází k mrznutí nebo tání rostlinného materiálu, což je při kryoprezervaci velmi významné (Benson, 2008).

Rozmnožování rostlin v *in vitro* podmínkách patří mezi moderní biotechnologie. Takto množené rostliny mají spoustu předností oproti rostlinám pěstovaným klasickým způsobem. Selekcí a množením zdravého a životaschopného rostlinného materiálu můžeme získat sadbu, která je vhodným množitelským materiálem pro další kultivaci. Velikost multiplikačního koeficientu při šlechtitelské práci se druhově odlišuje. Zvýšení multiplikačního koeficientu má význam pro šlechtitele, množitele a pěstitele nejen kulturních plodin a okrasných rostlin, ale i pro kryoprezervaci a uchování rostlin.

Česnek je jednou z nejcennějších užitkových rostlin na Zemi. Má specifickou chuť a aroma, zvláště je ceněn pro své léčivé účinky jako přírodní antibiotikum, pozitivně upravuje krevní tlak, snižuje hladinu cholesterolu a má protizánětlivé účinky. V genové bance v Olomouci se nachází největší mezinárodní kolekce dlouhodobých česneků na světě. Tato kolekce je od roku 1986 součástí monitorovacího programu mezinárodní instituce genetických zdrojů rostlin (IPGRI, Řím) a je finančně podporována Národním programem konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity Ministerstva zemědělství (Anon., 2003). V rámci EU jako výsledek řešení projektu EURALLIVEG byla vytvořena tripartitní kryobanka rodu *Allium*, která kromě české kolekce zahrnuje i kolekce česneku v Polsku a Německu.

2 Literární přehled

Česnek je znám jako jedna z nejstarších kulturních rostlin světa. Jako všechny liliovité rostliny byl česnek považován za podsvětní rostlinu*. Faraoni a kněží se raději pozření česneku vyhýbali, neboť se domnívali, že ho nebeská božstva nemají v oblibě. Spolu s cibulí ho ale dávali otrokům (dnes se uvádí: svobodným dělníkům a kvalifikovaným řemeslníkům, kteří stavěli pyramidy) jako lék proti infekcím (Cattabiani *et al.*, 2006).

Česnek původem pochází z oblasti Střední Asie – Džungarsko (severní Čína), hory Pamíru, Altaje, Kirgizská step, Tádžikistán a Uzbekistán. V dnešní době zde planý česnek dále roste, kvete a nasazuje semena (Konvička a Würfel, 1998). Procesy opylování a vývoje semen česneku jsou závislé na délce dne a probíhají úspěšně jen v areálech blízkých 37 ° severní šířky, kde převažuje desetihodinová délka dne (Kamenetsky *et al.*, 2004). V našich podmínkách *Allium sativum* nekvete a netvoří semena.

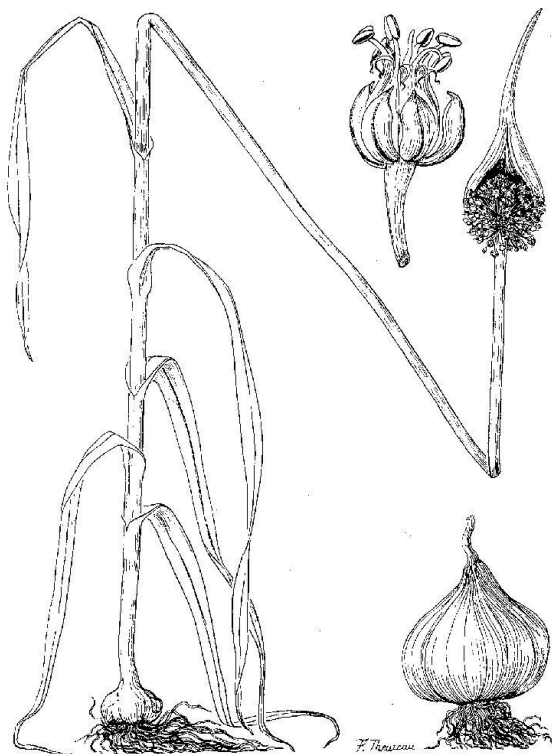
Z botanického hlediska se česnek řadí do rodu *Allium*, z čeledi *Alliaceae*, řádu *Asparagales*, třídy *Monocotyledones (Liliopsida)* a oddělení *Magnoliophyta* (Krahulec a Duchoslav, 2010). Rostliny tohoto rodu jsou vytrvalé byliny s cibulemi nebo oddenkem. Listy jsou přízemní, někdy s dlouhou pochvou kryjící dolní část stvolu, střídavé, dvouřadě nebo šroubicovitě uspořádané, přisedlé nebo řapíkaté, nitkovité až vejčité. Stvoly jsou plné nebo duté. Květy jsou ve vrcholičnatých květenstvích (lichookolících nebo lichopřeslenech), do rozkvetu uzavřené v listenu (toulci), oboupohlavné, pravidelné, 3četné. Okvětní lístky v počtu 6, volné, někdy na bázi srostlé; tyčinky zpravidla v počtu 6, na bázi vzájemně srůstající a někdy přirostlé k okvěti, prašníky introrzní; gyneceum synkarpní, ze 3 plodolistů, placentace nákoutní, semeník svrchní, čnělka jedna. Plodem je tobolka se 3 pouzdry, pukající švy, pouzdrosečná, se 6 nebo více semeny. Semena mají endosperm; zárodek je přímý nebo

* V Egyptě se věnci z česneku a cibule krášlili ctitelé boha Sokata, jednoho z nejstarších podsvětních božstev. Vyznavači bohyně Baset, Matky Země, které byly zasvěceny kočky, měli tehdy ve zvyku žvýkat česnek a cibuli. Řekové obětovali česnek bohyni Hekaté – řecká všemocná bohyně, vládkyně tajemných sil, měsíce, noci a podsvětí. Alfons Castillský choval k této rostlince takový odpor, že když založil rytířský řád, nařídil rytířům, že pokud se někdo z nich dopustí té nerozvážnosti a sní česnek nebo cibuli, celý měsíc se nesmí objevit na dvoře a nesmí mluvit s ostatními. Taoisté stejně jako brahmáni tvrdí, že česnek posiluje demony v těle, a proto se jeho konzumaci vyhýbají. Česnek jako amulet a talisman – věří se, že má mimo léčivých vlastností další kladné vlastnosti. Zajišťuje ochranu před všemi kouzly a čarodějnicemi, v sanskrtu je nazýván „zabijákem nestvůr“. Z důvodu ochrany před uhrnutím se doporučovalo nosit jej pod košilí za svatojánské noci, společně s dalšími bylinami, jako jsou třezalka, routa nebo pelyněk (Cattabiani *et al.*, 2006).

zakřivený. Je známo 32 rodů s asi 900 druhy, rozšířenými na všech kontinentech kromě Austrálie a Nového Zélandu (Krahulec a Duchoslav, 2010).

Rostliny česneku jsou vytrvalé byliny s charakteristickou výraznou vůní po cibuli či česneku (Obr. 1). Cibule jsou přisedající na krátký oddenek nebo samostatné s oddenkem redukovaným jen na podpučí, jednotlivé nebo nahlučené, složené z jedné až několika zásobních šupin (zdužnatělých bází listů), obvykle se kryjících („suknice“), nebo zřídka ze zdužnatělých kolaterálních pupenů („stroužků“). Listy přízemní, přisedlé nebo řapíkaté. Stvolů většinou přímé nebo šikmo vzhůru směřující, oblé až hranaté. Květenství většinou vrcholový lichookolík, zprvu zcela uzavřený v toulci, u řady druhů s pacibulkami. Rod s více než 800 druhy rozšířenými v mírném pásu severní polokoule (s výjimkou 1 druhu vyskytujícího se v jižní Africe) (Krahulec a Duchoslav, 2010), z toho je 30 druhů užitkových, 20 druhů okrasných.

***Allium sativum* L.**

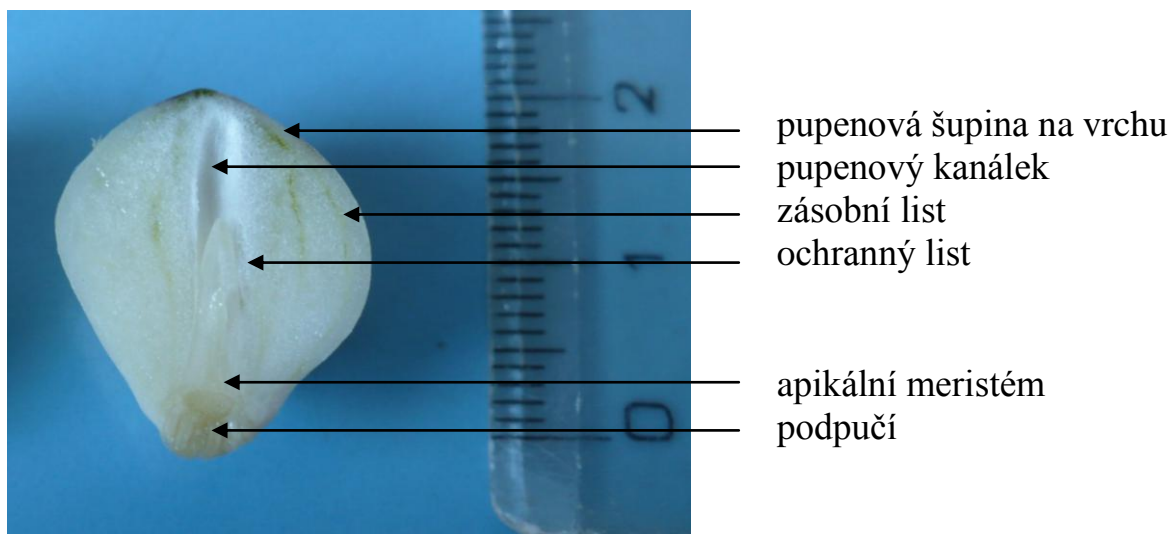


Obrázek 1. Vzhled rostliny česneku *Allium sativum* L. Celá rostlina s čárkovitými listy, cibule na zkrácené ose podpučí, květní stvol zakončený vrcholovým lichookolíkem s pacibulkami (Anon., 2010).

Většina z nich se řadí mezi významné zeleniny, koření a léčivé rostliny. Mezi nejdůležitější užitkové druhy patří česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.), česnek kuchyňský pravý (*Allium sativum* subsp. *sativum*, mutant planého *Allium longicuspis* Regel), česnek kuchyňský rokambol (*Allium ophioscorodon* Link), cibule šalotka (*Allium salota* Dost.), cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.), cibule zimní, sečka (*Allium fistulosum* L.), pór zahradní (*Allium ampeloprasum* L.), pažitka pobřežní (*Allium schoenoprasum* L.) (Krahulec a Duchoslav, 2010). Dalším společným znakem pro tento rod je tvorba éterických olejů, jejichž podstatou jsou složité sirné vazby (např. alliin, allicin, ajoen, diallylsulfidy a polysulfidy, isoalliin), které vytvářejí charakteristickou vůni (Konvička a Würfel, 1998).

Druh *Allium sativum* L. – česnek kuchyňský je bylina 20–100(–200) cm vysoká. Cibule je téměř kulovitá až krátce baňkovitá, složená z 5–15(–60) zdužnatělých kolaterálních pupenů („stroužků“), uzavřených v blanitých bílých, později podélně rozpadavých šupinách. Listy jsou v počtu 4–12; čepel je čárkovitá až čárkovitě kopinatá, až 60 cm dlouhá, 6–30 mm široká, na vrcholu špičatá, kápoovitá na líci plochá, na rubu kýlnatá, na okraji a na kýlu někdy drsná. Stvol je přímý. Lichookolík kulovitý 2,5–5,5 cm v průměru, vždy s pacibulkami v počtu 20–100; květní stopky 1–2 cm dlouhé, křivolaké, zakončené zakrnělými, deformovanými květy; toulec až 23 cm dlouhý, celistvý bylinný, opadavý se zobánkem až 25 cm dlouhým. Okvětní lístky (1–)3(–5) mm dlouhé, na vrcholu špičaté, zelenavě bílé či růžové; tyčinky kratší než okvěti, nitky 6–8 mm dlouhé. Tobolky ani semena se nevytvářejí. Příležitostně tento druh zplaňuje na okrajích vesnic v teplejších oblastech, trvalé zplanění však není uváděno. Přestože jde o druh téměř zcela bez pohlavního rozmnožování, pěstuje se velké množství kultivarů, jejich klasifikace do taxonomicky pojatých jednotek není v současnosti akceptována (Krahulec a Duchoslav, 2010).

Pěstitelsky se česneky rozlišují na výnosnější ozimé formy, a na jarní formy. Z morfologického hlediska dělíme česneky na paličáky (vybíhavé) a nepaličáky (nevybíhavé). Z anatomického hlediska nejsou jejich květní pacibulky semena, ale pupeny (stejně tak jako stroužky), jsou to tedy vegetativní části mateřské rostliny. Na spodní části pupenu (stroužku) česneku se nachází podpučí, ze kterého vyrůstá apikální meristém. Apikální meristém je chráněn ochranným listem, který tvoří 2. a 3. list a prorůstá celým pupenem, tzv. pupenovým kanálkem, který je obalen zásobním listem (Obr. 2). Povrch pupenu kryje pupenová šupina (Kamenetsky a Rabinowitch, 2001).



Obrázek 2. Anatomie pacibulky česneku (foto autor).

Podpučí česneku tvoří zkrácený stoněk česneku, jenž představuje hlavní řídicí centrum růstu rostliny. Druh *Allium sativum* citlivě reaguje po dobu 260–270 dnů na změny teploty, délku dne, vodní režim, živiny, choroby, škůdce apod., čímž se také snižuje jeho rozmnožovací schopnost. Důležitou funkcí podpučí je rušení dormance stroužku, rašení prýtu a kořenů, obnova kořenů, ukládání zásobních látek v bazální části a tvorba cibule, tvorba a prodlužování květního stvolu, tvorba květních primordií (základů). Pokud rostliny česneku přijdou o část svých kořenů, potom zastavují růst a začínají předčasně tvořit cibuli (Ayabe a Sumi, 1998).

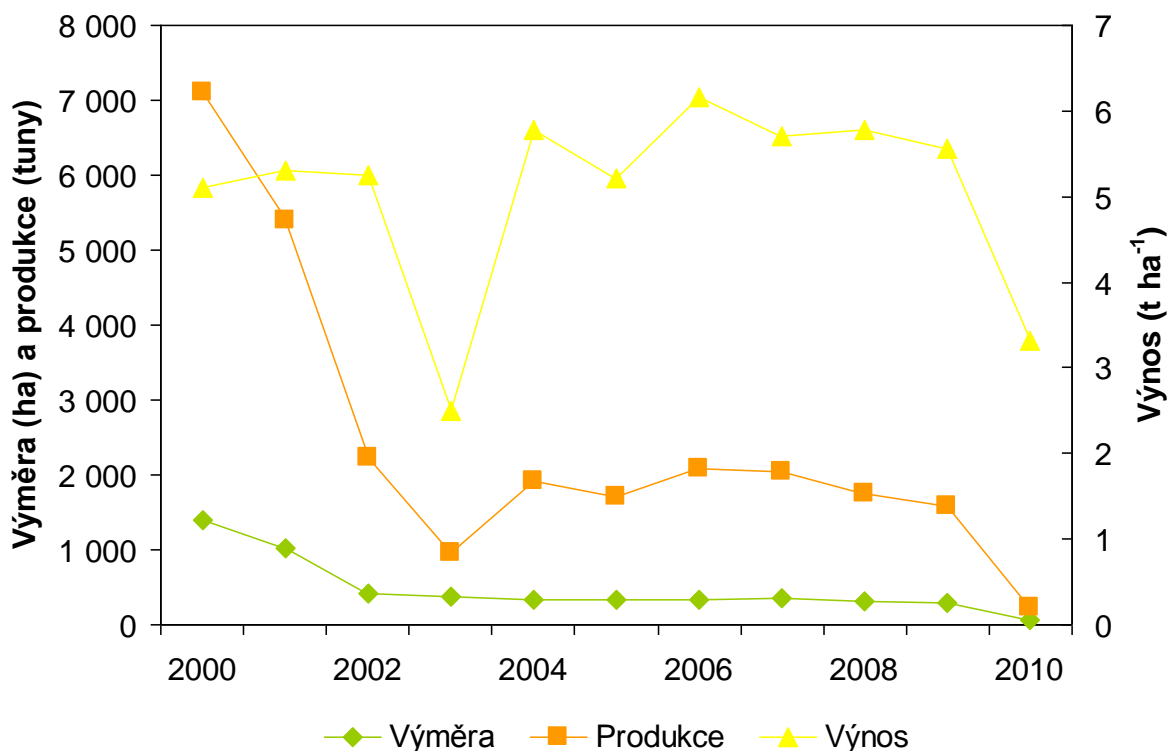
Pěstování česneku ve středoevropských podmínkách vyžaduje teplé a slunné polohy, lehčí humózní půdy (horské kamence) ve staré síle, a proto je nutné těžké půdy dobře odvodňovat (Konvička a Würfel, 1998). V našich podmínkách česnek kuchyňský nekvete, je sterilní a není schopný tvořit pyl, ani semena, množí se zde vegetativně. Příčinou jsou poruchy dělení jader v samčích i samičích pohlavních buňkách (Weber, 1928). Sklízet se musí česnek včas, protože se cibule brzy rozpadají, znovu začnou zakořeňovat a tím se zkracuje jejich skladovatelnost. Doba sklizně nastává obvykle v období žloutnutí listů a stvolů.

Nové biotechnologické metody jsou důležité pro množení rostlin využívaných v lékařství, zejména se jedná o adaptační metody *in vitro* kultivace a regenerace, které mohou být využity k produkci důležitých sekundárních metabolitů rostlin s léčivými účinky (Rout *et al.*, 2000). V dnešní době se druhy rostlin česneku používají především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Roční světová produkce česneku (Tab. 1) je přes 16,4 miliónů tun, přičemž největšími producenty jsou Čína (13,6 miliónů tun v roce 2010), Indie (0,8 miliónů

tun) a Korea (0,2 miliónů tun), v ČR se uvádí roční produkce (Obr. 3) česneku 1,7 tisíc tun (FAOSTAT, 2012).

Tabulka 1. Produkce česneku ve světě (produkce je uvedena v tunách) (FAOSTAT, 2012).

	2006	2007	2008	2009	2010
Čína	11 567 524	16 064 662	18 357 036	17 967 857	13 664 069
Indie	598 200	776 300	1 068 500	831 100	833 970
Republika Korea	331 379	347 546	375 463	357 278	271 560
Egypt	164 260	234 570	339 624	195 743	244 626
Rusko	255 860	249 047	226 670	227 270	213 480
Barma	146 200	161 000	197 300	200 730	185 900
Etiopie	68 308	68 303	103 542	179 658	180 300
USA	224 480	186 150	194 230	175 900	169 510
Ukrajina	145 600	131 500	136 800	150 100	157 400
Španělsko	145 372	151 674	133 610	154 000	136 000



Obrázek 3. Vývoj produkce česneku v České Republice (FAOSTAT, 2012).

2.1 Vnější a vnitřní podmínky působící na fyziologické vlastnosti *Allium sativum*

Konzervace genetických zdrojů rostlin je velmi důležitá pro potravinovou bezpečnost a agrobiodiverzitu. Pro potravinářství a farmaceutický průmysl je důležité neustále zlepšovat vlastnosti těchto plodin a rozšiřovat tak jejich diverzitu. Jejich ochrana je důležitá i pro další šlechtění rostlin. Biodiverzita je zdrojem různých druhů plodin pro průmyslová odvětví, léčiva a potravinářství. Současné moderní odrůdy se začínají nahrazovat místními kultivary a krajovými odrůdami tradičního agroekosystému. Znečištění životního prostředí, rozšiřování invazivních plevelů, mýcení lesů, klimatické změny, změna životního stylu, globalizace, tržní ekonomika, urbanizace a další změny vedou ke ztrátě diverzity. Konzervace rostlinných genetických zdrojů může být v přirozeném prostředí výskytu (*in situ*) nebo vně (*ex situ*). *Ex situ* konzervace zahrnuje polní genové banky, botanické zahrady, uchování semen v semenných bankách, uchování pylu a DNA. Dlouhodobé skladování zahrnuje desikaci semen na nízký obsah vody a uchování při nízkých teplotách. Semena některých druhů rostlin (tropické a subtropické druhy převážně stromů) jsou rekalcitrantní, tj. nesnesou snížení obsahu vody pod 30-80 % na rozdíl od ortodoxních, které přežijí dehydrataci pod 5 % (Berjak *et al.*, 1992). Další skupina rostlin, která nemůže být uchována v semenných bankách, jsou vegetativně množené rostliny. Tyto rostlinné druhy jsou obvykle uchovávány v polních genových bankách. Těmto kolekcím však hrozí genetická eroze a ztráta genotypu (škůdci, choroby, nepříznivé klimatické změny). V tomto případě je vhodný převod rostlin do *in vitro* kultury a jejich uchování pomocí procesu pomalého růstu nebo kryoprezervace.

Podobně je tomu u vegetativně množeného česneku, který při pěstování v polních podmínkách, kde často podléhá poměrně vysokému riziku napadení chorobami (virózy, bakteriózy, mykózy), škůdci (hád'átka, roztoči, květílka cibulová, třásněnky). V důsledku neustálého vegetativního množení se rostliny oslabují a také degenerují. Kultivace těchto rostlin pomocí meristémových kultur umožňuje pěstovat bezvirózní linie, bez přítomnosti bakterií, mykóz a škůdců, a proto je možné řešit tento problém uchováním a množením rostlinného materiálu v *in vitro* podmínkách (Keller, 2005).

Ozdravování česneku od virů pomocí explantátových kultur spočívá v odběru apikálních meristémů z matečních rostlin a jejich mikropropagaci a v následném použití virostatika, termoterapie nebo kryoterapie u kultivovaných rostlinných explantátů. Dalším krokem je vyhledání viruprostých jedinců pomocí ELISA testů. Ozdravení jedinci se

v karanténě namnoží a dále mohou být použiti jako bezvirózní elitní klony pro šlechtění a výrobu sadbového materiálu.

Kryoprezervovaná pletiva by měla být po odtání geneticky identická vzhledem k původnímu materiálu, bez fenotypových změn a mělo by být možné z nich opět vypěstovat normální rostliny. Nebezpečí genetické nestability je vždy důvodem k pozměnění kryoprotokolu. Během kryoprezervace dochází ke snížení metabolické aktivity na minimum vlivem nízké teploty, proto po odtání dostaneme identickou rostlinu – klon. Během skladování rostlin v tekutém dusíku nebyly pozorovány žádné morfologické, cytologické, biochemické nebo molekulární změny. Avšak při procesu kryoprezervace mohou nastat nepatrné změny genomu, proto je nutné jejich ověření. Genetická nestabilita a somaklonální variabilita mohou být způsobeny v genotypu a fenotypu kryoprezervovaných rostlin. Proto jsou dvěma nejdůležitějšími sledovanými faktory regenerace a genetická stabilita. Odlišnosti na úrovni ploidity jsou jedny z nejčastějších genetických změn v *in vitro* kulturách (Ovesná *et al.*, 2007). Chromosomální nestabilita je ovlivněna především genotypem a podmínkami *in vitro* kultur. Metody pro stanovení genetické diverzity se zakládají na fenotypové a morfologické charakterizaci, biochemických metodách (proteinová a enzymatická elektroforéza), molekulárních metodách (isozymové markery, metody založené na DNA: RFLP – restriction fragment length polymorphism, PCR – polymerase chain reaction, RAPD – random amplified polymorphic DNA, AFLP – amplified fragment length polymorphism, SSR – simple sequence repeats) (Ovesná *et al.*, 2007). Diverzita se již tradičně stanovuje pomocí fenotypových charakteristik jako jsou barva květu, rostlinný habitus, nebo kvantitativních agronomických vlastností jako jsou výnos, stresové tolerance apod. Histologická pozorování neukazují žádné změny po kryoprezervaci rostlin. DNA analýzy mohou být provedeny kdykoliv, v jakékoliv růstové fázi, může být použita jakákoliv rostlinná část a na analýzu stačí velmi malé množství materiálu (Chase *et al.*, 2005). Cytologická šetření neprokázala žádné chromosomální abnormality, naopak ukazují konstantní úroveň ploidity (Volk *et al.*, 2004a).

2.1.1 Růstové charakteristiky česneku

Růst můžeme definovat jako nevratné zvětšení objemu. Prodlužovací růst je tedy obecně nevratným zvětšením objemu podél určité osy, především podél osy stonku. Viditelné projevy růstu jsou u rostlin většinou spojeny s prodlužováním buněk produkovaných

meristematickými zónami buněčného dělení. Z apikálního meristému se regeneruje celá rostlina, z kořenové špičky se regeneruje kořen, sekce z internodia vytváří na řezné ploše kalus, boční meristémy podmiňují tloušťku stonků a kořenů (Novák, 1990).

Velkým problémem při skladování je rašení cibulí česneku. Dlouhodobým skladováním cibulí se ve své práci zabývá Pak *et al.* (1995). Vodní lázeň o teplotě 60 °C po dobu 2,5 minut zpomaluje rašení a růst kořenů česneku, aniž by došlo k jeho poškození (Cantwell *et al.*, 2003). Délku dormance ovlivňuje především teplota a vlhkost prostředí, ve kterém jsou cibule skladovány. Při teplotě 16 °C dochází k aktivaci enzymů invertázy a sacharázy štěpící disacharidy na jednoduché cukry a k iniciaci rašení. Přerozdělení vody a metabolitů je nezbytné pro tvorbu nových buněk a jejich prodlužovací růst. Existují mezidruhové rozdíly v délce trvání dormance česneku, u některých druhů nastává období klidu před začátkem růstu listů (Pak *et al.*, 1995).

Rostliny česneku z oblasti Centrální Asie vyžadují pro růst a vývoj roční teplotní cyklus teplo–zima–teplo, s velkými mezidruhovými rozdíly ve stupni otužování. Druhy z této oblasti vyžadují chladnou periodu od 4 do 17 °C po dobu 4 až 16 týdnů. Pro klíčení potřebují teploty od 5 do 15 °C. Začne se zvětšovat vzrostlý vrchol, který se prodlužuje, vzniknou první kořínky, po 4 měsících vyrostou první listy ze země. Na konci sezóny je vytvořena cibulka a listy s kořeny odumírají. V dalším roce se cibulka zvětší. V posledním roce vytvoří rostlina zároveň s listy květ a dělenou cibuli se stroužky (Kamenetsky, 1994).

Stanovení rezistence – mrazuvzdornosti rostlin vůči mrazu je důležitým znakem pro charakterizaci a hodnocení schopnosti odrůd odolávat biotickým zimním stresům (Prášilová a Prášil, 2008). Pro stanovení úrovně rezistence rostlin vůči mrazu se nejčastěji používá kritická teplota, při které dochází k 50% poškození rostlin nebo letální teplota, která udává teplotu mrazu, při níž dochází k 50% úhynu rostlin dané odrůdy. Hranice pro přežití jsou nejvyšší a nejnižší teploty, za kterých rostlina může přežít. U česneku nejsou tyto hranice z literatury doposud publikovány. Je třeba rozlišovat mezi hranicí aktivity a letální hranicí. Je-li překročena hranice aktivity, životní pochody se vratně zpomalují až na minimální rychlost a cytoplazma se ocitá ve stavu anabiózy (při nadměrném chladu nebo horku). Při překročení letální hranice dochází k trvalému poškození a život rostliny zaniká (Rascio a La Rocca, 2005).

2.1.2 Explantátové kultury

Rostlinná explantátová kultura je rostlinné pletivo, které se asepticky pěstuje v agarové kultuře ve skleněných nádobách, a které se neorganizovaně dělí. Agarová půda pro pěstování rostlinných explantátových kultur má čtyři základní složky: 1. anorganické ionty, nutné pro růst kultury, 2. zdroj energie, obvykle je to sacharóza nebo jiné cukry, 3. organické výživné látky jako vitamíny, inositol a jiné látky, které si rostlina nedovede sama syntetizovat, 4. růstové látky, což jsou většinou syntetické analogy rostlinných hormonů, především auxiny a cytokininy (Ziv a Lilien-Kipnis, 2000).

Po přenesení chemicky nebo fyzikálně (teplem a UV zářením) sterilizované části rostliny na agarovou půdu s potřebným složením dojde k proliferaci (prorůstání) nediferencovaného rostlinného pletiva – kalusu. Dediferencované buňky kalusu mají porušenou regulaci všech základních procesů. Většina těchto změn snižuje životaschopnost, ale některé ji také zlepšují. Mohou dokonce ve vzácných případech zlepšovat šlechtitelskou hodnotu rostlin. Větší pravděpodobnost vyvinout se v rostliny mají buňky se zvýšenou životaschopností. Tento typ genetické variability vzniklé v důsledku kultivace v explantátových kulturách se nazývá somaklonální variabilita (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994).

Metoda mikropropagace rostlin (Luciani *et al.*, 2001) je založena na vegetativním množení rostlin, přičemž potomstvo zůstává identické s mateřskou rostlinou. Explantátové kultury se nejčastěji pěstují na MS médiu (Murashige a Skoog, 1962). Mikropropagace rostlin, jejich regenerace, růst a multiplikace je závislá na chemickém složení kultivačního média, obsahu jeho mikroprvků a makroprvků a regulátorů růstu (Ayabe a Sumi, 1998). Srovnáním různých kultivačních médií se ve svých pracích zabývají především Luciani *et al.* (2001) a Kim *et al.* (2009). Velmi často se pro pěstování rostlin v *in vitro* podmínkách používá médium MS. Na MS médiu pěstovali rostliny česneku také Chung a Nam (2001), kteří měnili poměr dusíkatých látek, obsah sacharózy v médiu a přidávali různé koncentrace růstových regulátorů. El-Gizawy a Ford-Lloyd (1987) úspěšně vypěstovali explantáty česneku také na médiu B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

2.1.3 Osmotický stres rostlin

Osmotický potenciál je jedním z nejdůležitějších znaků určujících vodní poměry v rostlinách nebo rostlinných orgánech. Při příjmu a vylučování látek buňkou má důležitou

úlohu difúze a osmóza. Cytoplazmatické částice mají kinetickou energii, která je příčinou jejich neustálého pohybu. Rychlost difúze je určena velikostí a aktivitou difundujících molekul, stupněm koncentrace roztoku, viskozitou prostředí, teplotou apod. Pohyb látek polopropustnou membránou zajišťuje osmóza. K docílení rovnováhy různě koncentrovaných roztoků je nutné dodat roztoku určitý osmotický tlak (Kuleshova *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 2007).

Existuje několik metod pro stanovení osmotického potenciálu buněk. Jednou z metod je extrahování buněčné šťávy z listů rostlin, kdy se pomocí metody rosného bodu stanoví osmotický potenciál. Další metodou je stanovení tlaku, podílu prostupnosti látek symplastem a apoplastem nebo pomocí terčíkové metody (Salama, 2009).

Při stanovení osmotického tlaku platí Boyle-Mariottův zákon, který udává, že součin tlaku plynu a jeho objemu je stálý ($pV = \text{konst.}$). Gay-Lussakův zákon uvádí, že zvýšením teploty o 1 °C dochází ke zvýšení osmotického tlaku o 1/273 proti hodnotě při 0 °C, Avogadrův-Gerardův zákon zmiňuje, že ekvimolární roztoky mají při téže teplotě stejný osmotický tlak (N_A , Avogadrova konstanta $6,022 \cdot 10^{23}$ částic). Platnost těchto zákonů o plynech se později přenesla i na zředěné roztoky. Osmotický tlak můžeme vypočítat podle van't Hoffova zákona* (1):

$$\Psi_{\pi} = ciRT \quad (1)$$

kde Ψ_{π} je osmotický tlak (Pa), c je molární koncentrace roztoku (mol dm^{-3}), i je množství částic vzniklých z jedné molekuly disociací, R je molární plynová konstanta ($8,314 \text{ J K mol}^{-1}$) a T je absolutní teplota (K). Van't Hoffova rovnice (2) podle Darnella *et al.* (1987) se uvádí jako:

$$\Psi_{\pi} = RT(c_1 + c_2 + \dots + c_n) \quad (2)$$

kde Ψ_{π} je osmotický tlak, R je molární plynová konstanta, T teplota a c_n je koncentrace iontů v roztoku. Pro výpočet objemu buňky V lze použít vzorec (3):

$$V = \pi_e^0(V_0 - b) \frac{1}{\pi_e} + b \quad (3)$$

kde V je objem buňky, π_e je tlak osmoticky aktivních látek v extracelulárním roztoku, b je osmoticky neaktivní objem buňky, V_0 je izotonický objem buňky a π_e^0 extracelulární izotonický roztok (Callister *et al.*, 2006).

* J.H. van't Hoff (1901, Nobelova cena za chemii, Nizozemsko) byl první, kdo upozornil na podobnost se stavovou rovnicí ideálního plynu (Kodíček, 2004).

Vodní potenciál lze stanovit při změně koncentrace vodního roztoku v okolí buňky. V hypertonickém prostředí dochází k plazmolýze (Fuller *et al.*, 2004). Při tomto ději dochází k odchlípnutí cytoplazmy od buněčné stěny. Konvexní plazmolýza nastává při nízké viskozitě cytoplazmy a při zmenšení vakuoly, kdy dochází k rovnoměrnému oddělování cytoplazmy od buněčných stěn. Při vyšší viskozitě se objem cytoplazmy nerovnoměrně zmenšuje (Shock *et al.*, 1998) a současně s již odtrženými částmi jsou ještě části ulpívající na buněčných stěnách; zde se jedná o typ plazmolýzy konkávní. Chování buněk rostlin v různě koncentrovaných roztocích sacharózy popisují například práce Lang-Pauluzziho (2000) a Langa *et al.* (2004).

Výzkum detekce osmotického potenciálu, hydratace, teploty a jejich vlastností v rostlinách jsou předmětem mnoha prací zabývajících se odolností rostlin vůči mrazu (Bartels a Sunkar, 2005; Lang *et al.*, 2004; Mansour, 1998; Rascio a La Rocca, 2005; Shock *et al.*, 1998). Významné biofyzikální parametry jsou vkládány do matematických modelů pro znázornění kvantitativních podmínek (Kaldenhoff *et al.*, 2008). Jeden z modelů nabízí vysvětlení, jak je příchozí signál (teplota) vnímán a jak je tato informace dále vedena do rostlinných buněk. Tento model je založen na principu toku vápníku do cytoplazmy pomocí kanálků propouštějících Ca^{2+} v závislosti na teplotě. Ukazuje se, že právě tyto kanálky jsou prvními detektory, které zachycují teplotní změny v rostlinách (Katkov, 2002). Při určitých koncentracích vápníku může docházet ke stabilizování buněčných membrán vůči působení osmotického stresu (Elmoazzen *et al.*, 2002; Plieth, 1999).

2.2 Kvantifikace fyziologických vlastností

Sledování rychlosti příjmu a vylučování látek, plazmolýzy a deplazmolýzy rostlin, prostupnost látek buněčnou membránou, poškození dehydratací a nízkými teplotami umožňují především mikroskopické techniky. Přenosem látek rostlinnými pletivy se zabývají Palta a Lee-Stadelmann (1983), kteří používají fluorescenční metody na rostlinách česneku a cibule. Mikroskopické metody se v dnešní době využívají se stále vyspělejšími moderními metodami fluorescence a konfokální mikroskopie a s citlivější digitalizací s vyšším rozlišením obrazu. Podrobným popisem stereologických metod se zabývá ve své práci Tang *et al.* (2004).

Konfokální mikroskopie, na rozdíl od fluorescence, využívá laserového paprsku pro osvětlení pozorovaného objektu. Umožňuje provedení sériových řezů, které se opticky snímají, rastrují a posléze sesazují dohromady. Tím dosáhneme vyššího proostření tlustšího

řezu biologickými strukturami a získáme tak možnost vidět obraz v 3D zobrazení (Harris *et al.*, 2000).

V posledních několika letech dochází k prudkému rozvoji zařízení sloužících k digitálnímu záznamu obrazové analýzy. Tato metoda je vhodná pro záznam tvaru, velikosti, morfologických změn rostlin v průběhu jejich růstu. Metody obrazové analýzy se využívají při hodnocení růstových charakteristik (Kubota a Kozai, 1992).

2.2.1 Analýza obrazu

Samotný proces záznamu lze rozdělit do několika kroků: vytvoření a transformace obrazu pomocí čoček, zrcadel a svazků optických vláken; separace barevných složek pomocí vhodných optických filtrů (RGB, CMY); zaznamenání barevných složek obrazu; vygenerování jednotlivých obrazových bodů (pixelů) a barevných složek; přepis na digitální data; uložení těchto dat na paměťové médium.

Nejčastěji se obrazový záznam provádí ve 24 nebo 36 bitové barevné hloubce rozkladem do RGB složek. Skokovou změnou barev dochází k nahrazování spojitého barevného přechodu, tzv. kvantování. Chybu lze částečně eliminovat zvětšením barevné hloubky, přizpůsobením výběru barev nebo nerovnoměrným kvantováním odstínů barev. Shannonův vzorkovací teorém je podmínka, která uvádí, že pomocí matice pixelů nelze zobrazit větší detaily, než je poloviční vzdálenost pixelů $f_s > 2 f_{\max}$ (Zmeškal *et al.*, 2002). Ukládání digitálních dat vyžaduje velké množství paměti na médiu, protože pro potřeby obrazové analýzy je nutné zaznamenávat obraz v co nejvyšší kvalitě (statický obraz: TIFF, JPEG, méně vhodný BMP; animované sekvence: AVI, méně vhodný MPEG).

Nehomogenita osvětlení může být způsobena nedokonalostí optických prvků (vzorek je uprostřed zorného pole více osvětlen než na okrajích zorného pole). Proto je nutné provést tzv. gamma korekci, která upraví přenos jasů na lineární (Navarro *et al.*, 2007). Jedná se o vztah mezi hodnotami signálu na vstupu a výstupu optické soustavy. Pokud se gamma rovná jedné, potom je systém lineární. Upravení obrazu před vlastní analýzou spočívá ve snížení počtu údajů pro interpretaci výsledků, tj. převod barevného obrazu na škálu šedi (8 bit). Programy na vyhodnocení obrazové analýzy provádějí tzv. bitové operace (aritmetické plus, mínus; logické operace: and, or; podmíněné operace: minimum, maximum, difference, prahování). Je možné použití filtrů, které umožňují modifikaci obsahu pixelů (konvoluční, vyhlazovací, hranové, derivační, integračně derivační filtry) (Zmeškal *et al.*, 2002).

Základní analýza obrazových dat spočívá v měření délek a ploch studovaných objektů a určování histogramů v jednotlivých barevných prostorech. Komplexní analýza obrazových dat nepracuje s jednotlivými pixely, ale s celým obrázkem najednou. Využívá se zde transformace pomocí diskrétních periodických funkcí (Fourierova transformace – založena na opakování zmenšené harmonické funkce, méně výrazná data; Haarova transformace – využívá rozhraní černé a bílé plochy, zjišťování počtu definovaných objektů bez počítání) (Zmeškal *et al.*, 2002).

2.2.2 Regulátory rostlinného růstu

Pro stimulaci buněčného dělení a ovlivnění růstových procesů se aplikují fytohormonální látky, označované jako regulátory rostlinného růstu. Mezi nejčastěji používané růstové regulátory ze skupiny typu syntetických auxinů používaných na množení a stimulaci růstu česneku patří IBA: indolyl-3-máselná kyselina (Chung a Nam, 2001; Roksana *et al.*, 2002), NAA: kyselina &-naftyloctová (Ayabe a Sumi, 1998; Haque *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005) podporující prodlužovací růst, buněčné dělení a apikální dominanci (Haque *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Ziv a Lilien-Kipnis, 2000).

Nejčastěji používané regulátory rostlinného růstu ze skupiny cytokininů pro kultivaci česneku jsou BAP: 6-benzylaminopurin (Luciani *et al.*, 2001; Roksana *et al.*, 2002; Ray a Bhattacharya, 2008), 2-iP: isopentyladenin (Kim *et al.*, 2003; Myers a Simon, 1999; Roksana *et al.*, 2002), kinetin: N-(2-furylmethyl)-7H-purin-6-amin (Fereol *et al.*, 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Ray a Bhattacharya, 2008), podporují buněčné dělení a prodlužování, ruší apikální dominanci a zpomalují stárnutí.

Tabulka 2. Teoretické nejvyšší množství rostlin (MK/rok), které lze získat z 1 rostliny rychlostí MK 4 za 1 měsíc a rok subkultivace, při různé regeneraci rostlin (% RR) (Kotková *et al.*, 2012a).

% RR	MK/měsíc	MK/rok
30	1,2	9
40	1,6	281
60	2,4	36 520
80	3,2	1 152 922
100	4,0	16 777 216

Srovnávacím měřítkem rychlosti množení jednotlivých odrůd pro množitele je tzv. množitelský koeficient (MK), tj. poměr počtu životaschopných rostlin jedné generace k počtu rostlin předcházející generace. Při přepočtu MK v *in vitro* podmínkách za rok se používá

vzorec $N = (MK)^P$ (Hosoki a Yasufuku, 1992), kde N je teoretické množství získaných rostlin za 12 měsíců, MK je multiplikační koeficient (MK) a P je doba subkultivace přepočtená na měsíce (Tab. 2). Hodnota MK se při šlechtitelské práci druhově odlišuje (např. vegetativně množené rostliny jako česnek 4–8 rostlin za rok v polních podmínkách, okopaniny 5–10, mají nižší MK na rozdíl od semenem množených plodin např. obiloviny 18–25, hrách až 65–80). MK v *in vitro* podmínkách dosahuje mnohem vyšších hodnot. Zvýšení MK má význam především pro šlechtitele, množitele a pěstitele nejen kulturních plodin a okrasných rostlin. Zvyšováním regenerace a multiplikačního koeficientu rostlin česneku v podmínkách *in vitro* se zabývají v laboratořích po celém světě (Chung a Nam, 2001; Fereol *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006b; Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994; Roksana *et al.*, 2002). Nízká produktivita množení česneku (jedna rostlina má v průměru 4–15 stroužků za rok) vede ke hledání nových způsobů multiplikace. Některé česneky tvoří pacibulky (paličák, jedna rostlina má až 200 ks), některé česneky pacibulky netvoří vůbec (Kajimura *et al.*, 2000). Pro multiplikaci česneku lze využít kořenových špiček (ze 43 explantátů v průběhu 2 měsíců vyroste 315 nových rostlin, tj. multiplikační koeficient je 7,3) (Haque *et al.*, 1998) a kalusových kultur (Myers a Simon, 1999) získaných pomocí růstových regulátorů, zde však je problém nízké stability genetického materiálu a výskytu somaklonální variability.

Tvorba cibulek může být ovlivněna nejen fytohormony, ale i světelnými podmínkami, obsahem sacharózy (cukrů) v kultivačním médiu a teplotou při kultivaci (Le Guen-Le Saos *et al.*, 2002). Hodnoty osvětlení se u různých druhů rostlin liší, česnek potřebuje pro růst a tvorbu listů $60\text{--}100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, cibule roste při osvětlení $30\text{--}60 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nejvíce světla (až $260 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) vyžadují rajčata, fazole, okurky (Roksana *et al.*, 2002).

Pěstování rostlin v podmínkách *in vitro*, pomocí mikropropagace, s sebou přináší i některé potíže v podobě nejen kontaminací, při převodu rostlin z *ex vitro* do *in vitro* podmínek, ale také při další kultivaci se mohou projevit různé fyziologické poruchy, poruchy růstu, metabolické poruchy. Mezi tyto poruchy patří také hyperhydratovaná pletiva, která zapříčiňují změny v morfologii a anatomii rostliny (Caillot *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Hyperhydratované rostliny mají skelný vzhled, stonky a listy jsou zkrácené, ztloustlé, křehké, zkroucené, mají abnormální barvu, retardovaný růst, poškozené stonky a listy s hypertrofií buněk (Dyduch a Najda, 2001). Listy těchto rostlin jsou charakteristické sníženým obsahem proteinů a chlorofylů, vysokým obsahem vody, zvýšeným obsahem K^+ a buňky jsou značně zvětšené (Boettcher *et al.*, 1988; Perry *et al.*, 1999). Tyto změny mohou být vyvolány oxidačním stresem, který poškozuje buňky, např. při přípravě explantátové kultury se často

rostlina poraní nebo při povrchové sterilizaci rostlinného materiálu, kdy se používá chlornan sodný, chlorid rtuťnatý a soli. Dalšími příčinami vzniku hyperhydratovaných pletiv může být minerální deficit, vysoký obsah solí, nadbytek iontů kovů (Olmos *et al.*, 1997). Rostliny postižené hyperhydratací se dále vyznačují velkými intercelulárami, redukováným vývojem cévního systému, poškozenou epidermis a omezenou funkcí průduchů. Nabízí se několik hypotéz, které vysvětlují vznik hyperhydratace rostlinných pletiv: tekuté kultivační médium, nadbytek minerálních látek, vysoká koncentrace cytokininů, nízký obsah agaru, vysoká relativní vzdušná vlhkost v kultivační nádobě nebo osmotický šok (Boettcher *et al.*, 1988). Jako prevenci vzniku hyperhydratace lze použít pevnější agarové médium, snížit podíl dusíkatých látek v kultivačním médiu, kultivovat explantáty v kultivačních nádobách s ventilačními uzávěry, ale ani tímto se vždy problém hyperhydratace pletiv neodstraní.

2.2.3 Dehydratace rostlinných pletiv

Většina rostlinných buněk obsahuje vysoký podíl vody a jsou citlivé k nízkým teplotám. V průběhu zimního období jsou rostliny vystavovány celé řadě faktorů spojených s nízkou teplotou, které mohou poškodit či ohrozit životnost rostlin (ledová vrstva, střídavé mrznutí a tání, zaplavení vodou, dlouhodobé působení silné vrstvy sněhu, holomrazy, vysušování rostlin větrem a další) (Prášilová a Prášil, 2008).

Obsah vody je jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících schopnost přežití a regenerace rostlinného materiálu uchovaného v tekutém dusíku. Optimální obsah vody se musí předem stanovit, příliš mnoho vody způsobí poškození buněk tvorbou krystalů ledu, příliš málo vody způsobí vyschnutí a uhynutí buněk. Snížení obsahu vody k optimální hranici zapříčiní zvýšení koncentrace roztoku uvnitř buňky, který se stane viskózní a po dalším poklesu obsahu vody má vlastnosti skla. Zbylá voda je pevně vázána na povrchu makromolekul, a tím je redukován její pohyb. K prevenci poškození buněk ultra-nízkými teplotami tekutého dusíku slouží kryoprotektivní roztoky, které pronikají do buněk a dehydratují je, čímž dochází ke stabilizaci proteinů a membrán, nicméně způsob, jakým vše probíhá, je závislý na typu buňky, druhu rostliny, teplotě prostředí a složení dalších roztoků, které jsou používány (Niino *et al.*, 1992). Buňky při kryoprezervaci musí být dehydratovány bez vzniku ledových krystalů; fyzikální poškození nastává při tvorbě intracelulárních krystalů ledu během rychlého mrznutí a způsobí mechanické poškození především buněčných membrán. Při extracelulárním mrznutí vznikají ledové krystaly vně buněk a může dojít

k jejich poškození. Poškození buněk může nastat během procesu mrznutí při krystalizaci ledu, ale i v průběhu tání při procesu rekrystalizace. Jedním z nejdůležitějších ukazatelů pro přežití v nízkých teplotách je plazmatická membrána; její poškození během kryoprezervace ovlivňuje úroveň přežití a regenerace rostlinného materiálu. Fyzikální poškození plazmatické membrány je letální, protože dochází ke ztrátě semipermeability, nerovnováze komponentů v cytoplazmě, tvorbě ledových krystalů a dalšímu poškození buňky. Naproti tomu příliš vysoká dehydratace způsobí poškození buněčné membrány vysokou koncentrací rozpuštěných látek v cytoplazmě a denaturaci bílkovin. Kryoprotektivní látky zvyšují odolnost a stabilitu buněčné membrány, a tím se zvyšuje schopnost přežití rostlinných buněk. Způsob, jak předejít tvorbě ledových krystalů při nízkých teplotách, poškození buněčné membrány a příliš vysoké dehydrataci, spočívá v použití procesu vitrifikace, kdy se nevytvářejí ledové krystaly ledu, ale voda přechází do tzv. amorfního skelného stavu. Tohoto stavu lze dosáhnout dvěma způsoby: a) správnou koncentrací kryoprotektivního roztoku, b) správnou rychlostí mrznutí roztoku. Rostliny mohou přežít velmi vysokou dehydrataci cytoplazmy, mohou ztratit více než 90 % jejich relativního vodního obsahu a poté znovu normálně žít díky rehydrataci (Rascio a La Rocca, 2005). Cytoplazma reaguje na stres počátečním zrychlením metabolismu. Zvýšená respirace je důsledkem snahy o nápravu poškození. Je-li překročen horní nebo spodní kritický práh teploty, mohou být buněčné struktury a funkce poškozeny tak silně, že cytoplazma odumře. Nejprve nastává zastavení pohybu cytoplazmy, potom dochází ke snižování rychlosti fotosyntézy. V konečném stádiu se porušuje polopropustnost biologických membrán a buněčná cytoplazma proniká do mezibuněčného prostoru (Volk *et al.*, 2006). Poruchy vznikající ztrátou vody jsou spojeny s poškozením struktury cytoplazmy, dochází k nim při rychlé a silné ztrátě vody z buňky.

Přežití rostlin nebo rostlinných orgánů je závislé na schopnosti regulace obsahu vody: 1) omezením buněčného poškození na obnovitelnou mez vysychání, 2) udržení strukturální a fyziologické celistvosti buněk v dehydratovaném stavu a 3) rychlým nahrazením nebo obnovou poškozených buněk a dobrou schopností jejich rehydratace*. Ztráta většinového množství vody z buněk vede ke smršťování centrální vakuoly a k semknutí vnitřního obsahu buněk. Při odtrhávání cytoplazmy od buněčné stěny dochází k ochraně a udržení buněčné celistvosti, která je nezbytná pro přežití při následné rehydrataci buněk (Palta a Lee-

* Jedním z nejrychlejších cyklů dehydratace/rehydratace je znám u rostliny *Chamaegigas intrepidus* (Namibie, IUCN, červený seznam, LC – z angl. Least Concern, málo dotčený druh), který dosahuje dehydratace během 4 až 5 hodin a plně se hydratuje a metabolické aktivity dosahuje už za 2 hodiny (Schiller *et al.*, 1997).

Stadelmann, 1983). Voda se dostává do buněk přes membránu proteinovými kanály, které představují transmembránové proteiny, tzv. aquaporiny** (Kaldenhoff *et al.*, 2008; Rascio a La Rocca, 2005). Tyto proteiny se podílejí na příjmu vody kořeny, hydraulické vodivosti, transportu vody, zřídka i na regulaci transpirace a otevírání průduchů. Poruchy transportu vody jsou příčinou nebo průvodním jevem mnoha chorob (Bartels a Sunkar, 2005).

Strategie při dehydrataci rostlin spočívá v tvorbě organických osmolytik, jako jsou sacharóza, polyoly – vícemocné alkoholy, glycinebetain nebo prolin, některé druhy vytvářejí malé množství dalších cukrů, jako jsou rafinóza a trehalóza. V případě membrán dochází ve vztahu mezi cukry a polárními lipidy k ochraně tím, že tekutina zgelovává v průběhu desikace. To udržuje rostliny živé a zabraňuje další letální ztrátě vody až do následné dehydratace (Rascio a La Rocca, 2005).

Mezi hlavní osmolytika tvořící se u vyšších rostlin jsou řazeny glycinbetain (GB) a prolin (Pro). Obě látky jsou i při relativně vysokých koncentracích považovány za netoxické a neovlivňují letálně strukturu a funkci cytoplazmatické membrány. Pro jejich fyziologické vlastnosti byly navrženy jako osmoprotektivní látky, které poskytují ochranu membrány a zvyšují stabilitu membrán v různých podmínkách (sucho, mráz, teplo), mají protektivní účinky v průběhu desikace rostlinných pletiv, zahušťují buněčný obsah a vytvářejí tzv. biologické sklo (Bartels a Sunkar, 2005). K akumulaci prolinu dochází při nedostatku vody, vysokém obsahu solí, chladu, vysoké teplotě a při expozici těžkým kovům (Mansour, 1998). Neelektrolytická propustnost buněčné membrány zapříčiní pasivní přechod vnějších látek do vakuoly (Ozturk a Demir, 2002).

Dehydratace rostlinného materiálu způsobuje chemické a mechanické poškození buněk. Lyofilizované produkty (vysoušené mrazem) se vyznačují vyšší pórovitostí, lepšími rehydratačními vlastnostmi, minimální změnou vůně, barvy a biologické aktivity ve srovnání s metodami při vysoušení vzduchem nebo pomocí vakua (Sablani *et al.*, 2010). Citlivost vůči dehydrataci se liší v závislosti na rostlinném druhu. Úspěšnost regenerace rostlin po kryoprezervaci závisí především na schopnosti tolerance, citlivosti a odolnosti cytoplazmy vůči stresu způsobenému v průběhu kryoprezervace. Tolerance rostlin vůči dehydrataci může být zvýšena již v průběhu předkultivace, a to zvýšeným obsahem sacharózy a otužováním rostlin. Proces otužování, letální teplotu, inflexní bod poloviční asymptoty (přímky, jejíž vzdálenost se k dané křivce přibližuje ke krajním hodnotám osy x) popisují Von Fircks a

** Za objev transmembránových vodních kanálů obdržel roku 2003 Peter Agre (americký biochemik, nar. 1949) Nobelovu cenu (Kodíček, 2004).

Verwijst (1993) pomocí Richardsovy funkce. Uvádí, že tolerance rostlin k mrazu je závislá na podmínkách při mrznutí (nukleace, podchlazení). Existují různé mechanismy, které mohou ovlivnit toleranci rostlin k dehydrataci, např. snížení počtu vakuol, snížení obsahu nerozpustných zásobních látek, vnitrobuněčná de-diferenciace, která může zmenšit povrch membrán a cytoskeletu, snížení metabolismu na minimum, hromadění ochranných látek jako jsou proteiny a dehydriny, sacharóza nebo oligosacharidy. Carpentier *et al.* (2008) ve své práci ukazuje, že 28 proteinů korelovalo s osmotickým stresem a 59 proteinů bylo v korelaci s působením sacharózy.) V průběhu dehydratace zvyšuje stabilitu buněčných membrán hromadění cukrů, které odstraňují vodu z povrchu membrán, a tím podporují lipidovou dvouvrstvu. Proces vitrifikace sacharózou nebo oligosacharidy vede k tvorbě skelného stavu. Vysoká viskozita vzniklého skla snižuje riziko poškození nebo metabolických změn, chrání makromolekuly proti denaturaci a minimalizuje přechod tekutých krystalů do gelové fáze na lipidové dvoumembráně. Postupné zvyšování koncentrace sacharózy snižuje její toxicitu – při vysokých koncentracích, je vhodnější používat postupnou řadu koncentrací, než rovnou finální koncentraci. Tolerance k dehydrataci může být zvýšena také přizpůsobením se metabolismu. Při otužování rostlin v přírodě obvykle dochází k hromadění proteinů, především proteinů teplotního šoku (z angl. heat shock protein), proteinů regulujících chlad, dehydrinů, cukrů, polyamidů a dalších látek, které chrání buněčné části při dehydrataci.

2.3 Složení a koncentrace kryoprotektivních látek

Pro zachování genetických zdrojů vegetativně množených rostlin se používají metody kryoprezervace, s využitím zamrazení biologických objektů do ultra-nízkých teplot tekutého dusíku. Hlavním důvodem je indukce a přítomnost skelného stavu v rostlinných pletivech při ultra-nízkých teplotách. Každý rostlinný druh však vyžaduje poněkud odlišný postup kryoprezervace a vlastní kryoprotokol. K osmotické dehydrataci se obvykle používají vitrifikační roztoky (PVS), které jsou číslovány v pořadí podle vzniku a odlišují se složením základních kryoprotektivních látek a jejich koncentrací. Kryoprotektivní látky pomáhají chránit rostlinné buňky před mrazem, zabraňují letální ztrátě vody a zvyšují procento přežití a regenerace po kryokonzervaci. Kryoprotektivní látky zabraňují tvorbě intracelulárních krystalů ledu. Znalost teploty skelného přechodu je užitečná nejen pro zlepšení metod založených na existenci skelného stavu, ale je současně nezbytná pro získávání informací o vzrostných vrcholech určených pro bezpečné dlouhodobé skladování.

2.3.1 Kryoprotektivní látky

Kryoprotektivní látky, které se používají v takové koncentraci, aby došlo k vitrifikaci, mají obvykle škodlivé účinky. Tyto negativní účinky byly sledovány na změnách buněčného metabolismu a jejich přežití. Úspěšná kryoprotekce spočívá nejen v eliminaci tvorby ledových krystalů, ale také ve snížení toxicity kryoprotektivní látky. Kryoprezervace je vratný proces v případě, že je použita optimální kombinace a koncentrace kryoprotektivní směsi, která je dostatečně účinná pro tvorbu vitrifikovaných rostlinných pletiv.

Působením protektivních látek na buňky vzniká v rostlině osmotický stres. Tyto látky (Elmoazzen *et al.*, 2002) dělíme dle způsobu průniku do buňky v *in vitro* podmínkách do několika skupin: a) látky pronikající do buněk přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu, kterými jsou glycerol a dimethylsulfoxid (DMSO); b) látky pronikající pouze přes buněčnou stěnu, např. oligosacharidy jako sacharóza, manitol; aminokyseliny jako neesenciální aminokyselina prolin; polymery s nízkou molekulární hmotností jako ethylenglykol (EG), polyethylenglykol PEG₁₀₀₀; c) látky nepronikající ani přes buněčnou stěnu ani přes cytoplazmatickou membránu, mezi které patří polymery s vysokou molekulární hmotností jako rozpustné proteiny, polysacharidy, polyethylenglykol PEG₆₀₀₀ a polyvinylpyrrolidon PVP (Tao a Li, 1986; Volk a Caspersen, 2007). Základní vlastnosti látek používaných při kryoprezervaci shrnuje Tab. 3. Díky těmto vlastnostem látek je možné kontrolovat osmotické poměry v rostlině a jejich úspěšnou regeneraci po vystavení rostlin ultra-nízkým teplotám s cílem zachovat jejich genetickou informaci.

Vitrifikační roztoky pomáhají zajistit stabilitu membrán a enzymů při následné dehydrataci kryoprotektivními látkami a tvorbě ledových krystalů (Kartha a Leung, 1979; Kim *et al.*, 2006b). Vzorky jsou v tomto případě vystaveny několikaminutovému až několikahodinovému působení kryoprotektivních látek, kdy dochází ke snížení obsahu vody ve vzorku, dehydratované vzorky jsou potom zamrazeny v tekutém dusíku. Mezi přirozené kryoprotektivní látky rostlin patří sacharidy a osmoticky aktivní látky, např. prolin. Nejběžnějším kryoprotektantem je sacharóza, dále manitol a sorbitol, které pomáhají rostlinný materiál dehydratovat a zároveň působí kryoprotektivně uvnitř buněk (Santarius, 1990).

Tabulka 3. Charakteristiky nejčastěji používaných kryoprotektivních látek a roztoků

KL	RMM (g/mol)	T _g (°C)	T _m (°C)	SH	LD ₅₀	Citace T _g
DMSO	78,13	-132	18	1,10	**	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
EG	62,07	-113	-13	1,11	*	(Lu a Liu, 2004)
Formamid	45,04	-	3	1,13	*	
Fruktóza	180,16	5	103	-	*	(Kuleshova <i>et al.</i> , 1999)
Glukóza	164,16	23	147	1,04	*	(Jaya a Das, 2009)
Glycerol	92,09	-83	19	1,26	*	(Simperler <i>et al.</i> , 2006)
Mannitol	182,17	-25	166	1,52	**	(Zondervan <i>et al.</i> , 2007)
PEG 300	300	41	-15	1,13	***	(Pyne <i>et al.</i> , 2002)
PEG 400	400	-73	6	1,13	***	(Jonnalagadda a Robinson, 2004)
PEG 600	600	-68	23	1,13	***	(Murthy a Singh, 2008)
PEG 1450	1450	51	44	1,18	***	(Jonnalagadda a Robinson, 2004)
PEG 3350	3350	52	56	1,09	***	(Jonnalagadda a Robinson, 2004)
PEG 8000	8000	55	63	1,21	***	(Jonnalagadda a Robinson, 2004)
PG	76,1	-101	-59	1,04	**	(Jonnalagadda a Robinson, 2004)
PVP	40000	35	300	1,25	*	(Murthy a Singh, 2008)
Sacharóza	342,3	60	186	1,59	***	(Fahy <i>et al.</i> , 2004)
Sorbitol	182,17	-6	112	1,49	**	(Simperler <i>et al.</i> , 2006)
Trehalóza	378,33	107	97	1,58	*	(Talja a Roos, 2001)
Xylitol	152,15	-24	94	1,52	***	(Simperler <i>et al.</i> , 2006)
PVS1	42,47	-122	-41	-	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 2008)
PVS2	37,51	-119	-44	-	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 2008)
PVS3	56,29	-	-35	-	-	
PVS4	73,53	-	-34	-	-	
VSL	32,97	-125	-41	-	-	(Suzuki <i>et al.</i> , 2008)

Pozn. KL kryoprotektivní látka; RMM relativní molekulová hmotnost; T_g skelný přechod; T_m teplota tání; SH specifická hmotnost při 20 °C (voda=1); LD₅₀ střední smrtná dávka (dosis letalis media): * < 5 000, ** 5 001-20 000, *** > 20 001 mg/kg, ml/kg (myš, krysa, králík); DMSO dimethylsulfoxid; EG ethylen glykol; PEG polyethylen glykol; PG propylen glykol; PVP polyvinylpyrrolidon; PVS1-4 vitrifikační roztoky; VSL vitrifikační roztok; - není definováno

Často používanými kryoprotektanty jsou glycerol, ethylenglykol (EG) a dimethylsulfoxid (DMSO), které se používají při přípravě kryoprotektivních roztoků (PVS – Plant Vitrification Solution).

Vitrifikační roztoky jsou směsi látek, které vedou u kryoprezervovaného materiálu, ke vzniku skelného stavu. Při použití u rostlin se obvykle označují se zkratkou PVS, podle anglického názvu Plant Vitrification Solution, a nesou pořadové numerické označení. Vitrifikační roztoky jsou charakterizovány různým složením kryoprotektivních látek a odlišnou koncentrací jejich složek (viz Tab. 4). Kryoprotektivní látky musí splňovat několik základních parametrů, které se týkají způsobu jejich prostupnosti do buňky, viskozity, toxicity a minimální koncentrace potřebné pro vitrifikaci, která eliminuje vznik ledových krystalů. Metody, při kterých se používají vitrifikační roztoky jsou velmi rozšířené. První popsal metodu kryoprezervace s použitím vitrifikačního procesu Luyet (1937). Po prudkém ochlazení byl pozorován skelný stav také u rostlinných buněk (Sakai *et al.*, 1968). Širší vývoj a využití vitrifikačních roztoků vhodných pro kryoprezervaci rostlinných buněk probíhá především v posledních dvaceti letech (Liu *et al.*, 2004a; Nishizawa *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2008; Uragami *et al.*, 1989). Nejvíce používané kryoprotektivní roztoky jsou označovány jako PVS2 a PVS3. Jejich modifikace a využití jsou uvedeny v Tab. 5 a 6.

Vyšší účinnost vitrifikačních metod byla dosažena při využití předkultivace rostlin před kryoprezervací vzrostných vrcholů rostlin (Dumet *et al.*, 2002; Sakai a Engelmann, 2007). V průběhu předkultivace na sacharidy obohaceném kultivačním médiu dochází v rostlinách k příjmu sacharidů, zvýšení obsahu prolinu a dalších ochranných látek ve vzrostných vrcholech. Množství vody v buňkách vlivem hromadění těchto látek klesá, centrální vakuola se dělí na více menších vakuol (Getz a Klein, 1995).

Tabulka 4. Složení základních vitrifikačních roztoků pro kryoprezervaci rostlin

Vitrifikační roztok	DMSO (%)	Sach. (%)	Gly. (%)	EG (%)	PG (%)	PEG (%)	Sor. (%)	Form. (%)	BSA (%)	Rostlina	Citace
Fahy*	20	-	-	-	15	-	-	20	-		(Rall a Fahy, 1985)
Steponkus*	-	40	-	50	-	-	15	-	6	<i>Secale cereale</i>	(Langis a Steponkus, 1990)
PVS1	6	40	22	13	13	-	-	-	-	<i>Asparagus officinalis</i>	(Uragami <i>et al.</i> , 1989)
Towill*	1M	40	-	35	-	10	-	-	-	<i>Mentha sp.</i>	(Towill, 1990)
PVS2	15	15	30	15	-	-	-	-	-	<i>Citrus sinensis</i>	(Sakai <i>et al.</i> , 1991)
PVS3	-	50	50	-	-	-	-	-	-	<i>Asparagus officinalis</i>	(Nishizawa <i>et al.</i> , 1993)
PVS4	-	60	35	20	-	-	-	-	-	<i>Malus sp.</i>	(Sakai, 2000)
PVS5	-	-	-	10	-	-	-	-	-	<i>Malus sp.</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 1995)
VS6	10	10	30	-	-	-	-	-	-	<i>Porphyra yezoensis</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2004a)
PVSL	10	45	40	10	-	-	-	-	-	<i>Malus sp.</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2004b)
VSL	10	5	20	30	-	-	-	-	-	<i>Gentiana scabra</i>	(Suzuki <i>et al.</i> , 2008)

Pozn. DMSO dimethylsulfoxid; Sach. sacharóza; Gly. glycerol; EG ethylen glykol; PG propylen glykol; PEG polyethylen glykol; Sor. sorbitol; Form. formamid; BSA albumin z hovězího séra; * vitrifikační roztok podle jména autora; PVS vitrifikační roztok z angl. Plant Vitrification Solution; VS vitrifikační roztok z angl. Vitrification Solution; PVSL vitrifikační roztok z angl. Plant Vitrification Solution Liu (Liu, 2004); VSL vitrifikační roztok z angl. Vitrification Solution L

Vliv složení kryoprotektivních roztoků na úspěšnou regeneraci rostlin byl studován u různých druhů rostlin, např. bramboru, česneku, hořce apod. (Ellis *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004a; Tanaka *et al.*, 2004). Vitřifikční roztoky jsou tedy vodné roztoky kryoprotektivních látek, které mohou pronikat do buněk rostlin, kde postupně dehydratují pletiva, zároveň zabráňují cytotoxicitě a chrání buňky před tvorbou ledových krystalů ze zbylých molekul vody (Volk a Caspersen, 2007). Nejčastěji používanými kryoprotektivními látkami jsou v pořadí glycerol, dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol (EG), propylenglykol (PG), sacharóza nebo sorbitol v různých koncentracích (Kim *et al.*, 2009) v kombinaci s MS médiem, které umožňují rostlinný materiál dostatečně dehydratovat a zároveň působí uvnitř buněk kryoprotektivně (Kanaze *et al.*, 2006). Nejrozšířenějším kryoprotektantem je DMSO, který se používá při zamrazování jak živočišných tkání, tak i rostlinných pletiv, ale také při práci s mikroorganismy (Kobayashi *et al.*, 2005). Cukry se často přidávají do kryoprotektivních směsí, kde napomáhají dehydrataci explantátů. Mají za úkol ochránit integritu membrán v dehydrovaném stavu (Kim *et al.*, 2009). Glycerol a sacharóza jsou méně škodlivé než ostatní běžně používané kryoprotektivní látky jako DMSO, PEG nebo EG (Kim *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2005). Glycerol se používal jako první kryoprotektant při kryoprezervaci myších embryí (Rall, 1987). Poté byl objeven DMSO jako účinná kryoprotektivní látka, který má zásaditý charakter, je dobrým ligandem, snadno se alkyluje silnou zásadou a podléhá deprotonaci. Původně se DMSO používal při kryoprezervaci červených krvinek a spermií. Prostupuje pletivem velmi rychle, a to i při nízkých teplotách, a má dobrou schopnost tvorby skla. EG se používá pro jeho rychlou prostupnost do buněk a tendenci blokovat tvorbu ledových krystalů. Glycerol proniká díky jeho větší molekulové hmotnosti a viskozitě do pletiv rostlin pomaleji než DMSO a EG. Amidy oproti polyolům mají obecně slabé kryoprotektivní účinky, například formamid má slabou schopnost vitřifikace, ale může napomáhat při vitřifikaci v kombinaci s dalšími kryoprotektivními látkami. Přidáním methylové skupiny se zvyšuje účinnost kryoprotektantů.

Rostlinný vitřifikční roztok (Plant Vitrification Solution – PVS2) je složený z (w/v) 30 % glycerolu, 15 % dimethylsulfoxidu (DMSO) a 15 % ethylenglykolu (EG) v kultivačním médiu s $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ sacharózou. Celková molarita je potom $7,8 \text{ mol l}^{-1}$, což je pro rostlinná pletiva vysoce toxické. Proto je nezbytné při aplikaci roztoku velmi přesně dodržovat teplotu a dobu účinku. V zájmu ochrany rostlinných pletiv je nutné, aby kryoprotektanty prostoupily rostlinným pletivem, a to každou jeho buňkou tak, aby všechny buňky byly vystaveny jeho účinku (Ryynanen a Aronen, 2005). Naproti tomu složení PVS3 roztoku je 50 % w/v

glycerolu a 50 % w/v sacharózy. Tento roztok způsobuje pomalou dehydrataci rostlinných pletiv, která je podstatná pro dostatečnou ochranu rostlinného materiálu (Halmagyi *et al.*, 2005).

Tabulka 5. Modifikace vitrifikačního roztoku PVS2 používaného při kryoprezervaci rostlin

DMSO (%)	Sach. (%)	Gly. (%)	EG (%)	PEG (%)	Sorb. (%)	Rostlina	Citace
15	15	30	15	-	-	<i>Citrus sinensis</i>	(Sakai <i>et al.</i> , 1991)
15	40	30	15	-	-	<i>Malus domestica</i>	(Niino <i>et al.</i> , 1992)
7	-	22	15	15	50	<i>Asparagus officinalis</i>	(Uragami <i>et al.</i> , 1990)
13	15	25	15	2	-	<i>Guazuma crinita</i>	(Maruyama <i>et al.</i> , 1997)
15	13,7	30	15	-	-	<i>Allium sativum</i>	(Makowska <i>et al.</i> , 1999)

Pozn. DMSO dimethylsulfoxid; Sach. sacharóza; Gly. glycerol; Sorb. sorbitol; EG ethylenglykol; PEG polyethylenglykol

Tabulka 6. Modifikace vitrifikačního roztoku PVS3 používaného při kryoprezervaci rostlin

Metoda	Sach.	Gly.	Rostlina	Citace
V	50	50	<i>Asparagus officinalis</i>	(Nishizawa <i>et al.</i> , 1993)
V	50	50	<i>Allium sativum</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2006b)
V	40	40	<i>Gentiana</i> sp., <i>Wasabia</i> sp., <i>Malus</i> sp.	(Kami <i>et al.</i> , 2009)
KV	50	50	<i>Vanilla planifolia</i>	(Gonzalez-Arno <i>et al.</i> , 2009)
KV	50	30	<i>Malus</i> sp.	(Halmagyi <i>et al.</i> , 2010)

Pozn. M metoda; Sach. sacharóza; Gly. glycerol; V vitrifikační metoda; KV kapková-vitrifikační metoda

Dále jsou uvedeny některé vlastnosti nejdůležitějších kryoprotektivních látek. **Glycerol** je jedna z nejrozšířenějších kryoprotektivních látek. Díky jeho větší relativní molekulové hmotnosti a viskozitě proniká do pletiv rostlin pomaleji než DMSO a EG. Glycerol je v rostlinách zastoupen v množství esenciálních látek. Ve vyšších koncentracích se nachází v rostlinných orgánech, především v semenech nebo plodech, kde slouží jako zásobní látka. Při dýchání dochází k hydrolýze tuků lipázou na glycerol a mastné kyseliny, ze kterých při β -oxidaci vzniká acetylkoenzym A jako součást citrátového cyklu. V tomto procesu dochází k tvorbě 1 FADH₂ poskytující 2 ATP v dýchacím řetězci a 1 NADH + H⁺ poskytující

3 ATP. Glycerol se oxiduje na glycerinaldehyd-3-fosfát, který je součástí glykolýzy. Molekula glycerolu je polární, neomezeně mísitelná s vodou a jednoduchými alkoholy. Glycerol je slabě toxický. Používaná koncentrace glycerolu pro zamrazování je závislá na metodě kryoprezervace a pohybuje se v rozmezí od 20 do 50 % (w/v) glycerolu (Suzuki *et al.*, 2008).

Dalším rozšířeným kryoprotektantem je **DMSO** (Nishizawa *et al.*, 1993), který se používá při zamrazování jak živočišných, tak i rostlinných pletiv, ale také při kryoprezervaci mikroorganismů (Kim *et al.*, 2009). Nahrazením molekul vody prostupuje DMSO přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu velmi rychle i při nízkých kladných teplotách a má vysokou schopnost tvorby skla. DMSO je hydrofobní při vyšších teplotách, tzn., že je méně toxický při nižších teplotách, kdy dochází k nižší, pomalejší a snáze kontrolovatelnější dehydrataci pletiv a oxidaci sulfidické skupiny. DMSO je velmi účinné rozpouštědlo, které má vysokou osmolaritu. Je zdraví škodlivý a může vyvolat somaklonální variabilitu nebo i mutagenézi. V kombinaci s ethylenglykolem, glycerolem a sacharózou se používá DMSO jako kryoprotektivní roztok. Jeho optimální doba účinku je 20 minut při 0 °C (Volk a Walters, 2006).

Ethylenglykol působí při kryoprezervaci jako desikační činidlo. Díky nízkému bodu tuhnutí se používá také jako chladicí kapalina. EG se používá pro jeho rychlou prostupnost do buněk a má tendenci blokovat tvorbu ledových krystalů. V kryoprotektivních směsích se používá obvykle poloviční koncentrace ethylenglykolu v porovnání s glycerolem (Benson, 2008; Kim *et al.*, 2004a). Při metabolismu ethylenglykolu dochází k přeměně na kyselinu šťavelovou, která zvyšuje kyselost organismu a je zdraví škodlivá. V rostlinných pletivech reaguje kyselina šťavelová s vápníkem obsaženým převážně v buněčné stěně a vznikají nerozpustné krystaly šťavelanu vápenatého, které se ukládají ve vakuolách. Při velkých koncentracích může šťavelan vápenatý vykrystalizovat v různých formách stolidů, rafidů nebo drúz. Rovněž propylenglykol je běžně používanou kapalinou v procesu kryoprezervace. Při metabolismu dochází k přeměně na kyselinu šťavelovou, a působí obdobně jako ethylenglykol.

Polyethylenglykol je kapalina nebo tuhá látka v závislosti na molární hmotnosti (od 300 g mol⁻¹ do 10 000 000 g mol⁻¹). Jejich chemické vlastnosti jsou téměř stejné, ale díky různé molární hmotnosti mají široké uplatnění a různé fyzikální vlastnosti. Slučuje se hydrofobními molekulami a vznikají tak neiontové tenzidy. Při kryoprezervaci rostlin se používá koncentrace PEG do 15 w/v % (Hubalek, 2003).

V rostlinách byla objevena vysoká hladina **sacharidů** a cukerných alkoholů jako

přirozených netoxických kryoprotektivních látek. Monosacharidy se ochotně rozpouštějí v kryoprotektivních směsích a mohou tak vitrifikovat rostlinná pletiva při nižších koncentracích než disacharidy. Disacharid sacharóza, je častěji využíván jako kryoprotektant proti mrznutí a mrazovému poškození než pro indukcii samotného procesu vitrifikace. V tomto případě má vyšší efektivitu kryoprotekce ve srovnání s monosacharidem glukózou. Sacharidy napomáhají k dehydrataci vzorků a také se přidávají do kryoprotektivních směsí pro zvýšení ochrany integrity membrán v dehydrovaném stavu (Kim *et al.*, 2006b; Volk a Caspersen, 2007).

Monosacharid ze skupiny aldohexóz, **glukóza**, patří do skupiny redukujících sacharidů díky přítomnosti aldehydické skupiny, která se mění na karboxylovou za vzniku kyseliny D-glukonové. Silnější oxidační činidla oxidují molekulu glukózy na opačném konci a vzniká kyselina D-glukarová, oxidací primární alkoholické skupiny posledního uhlíku dochází ke vzniku kyseliny D-glukuronové. Naopak redukcí aldehydické skupiny glukózy na primární alkoholickou skupinu vzniká D-glucitol, označovaný jako **sorbitol**. Monohydrát D-glukózy vzniká v zelených rostlinách při procesu fotosyntézy, kde představuje nejrychlejší a nejzákladnější zásobu energie. Vzhledem ke své molekulové velikosti prostupuje buněčnou stěnou rychleji než sacharóza, avšak při praktickém srovnání regenerace rostlin po kryoprezervaci se ukázalo výhodnější použití sacharózy, stejně jako u alkoholického cukru **manitolu** (Halmagyi *et al.*, 2010).

Monosacharid **fruktóza** patří do skupiny ketóz. Při metabolismu fruktózy dochází k tvorbě fruktózy-1-P a přeměně ATP na ADP. Tento děj představuje výrazně větší zdroj energie než při procesu metabolismu glukózy. Při kryoprezervaci rostlinného materiálu se však používá zředka (Prychid *et al.*, 2008).

Maltóza je disacharid tvořený dvěma molekulami D-glukózy spojenými $\alpha(1-4)$ vazbou. Její použití při předkultivaci v procesu kryoprezervace mělo slabý účinek na přežití rostlin (Suzuki *et al.*, 2008).

Sorbitol se používá při kryoprezervaci pro jeho nižší bod tání (Bhandari a Roos, 2003; Suzuki *et al.*, 2008). Energeticky je méně bohatý (1 g sorbitolu uvolní 11 kJ = 2,6 kcal energie) oproti sacharóze. Goldner *et al.* (1991) ve své práci představili celou řadu sacharidů pro zvýšení odolnosti rostlin (*Digitalis lanata*) vůči mrazu, které použil při předkultivaci rostlin. V této práci však byly nejvíce poškozeny buňky rostlin kultivovaných na sorbitolu a prolinu. Naproti tomu, k nejmenšímu poškození buněk došlo při použití sacharózy. Koncentrace sorbitolu 0,4 M a 0,8 M při předkultivaci jedle (*Abies* sp.) se ukázaly jako

vhodné pro následné přežití a regeneraci těchto rostlin (Bryant *et al.*, 2001).

Glykolýza, rozklad sacharidů, hraje významnou roli ve stabilizaci enzymů a membrán při mrazovém poškození buněk. **Trehalóza**, neredukující disacharid složený ze dvou molekul glukózy spojených 1-1 vazbou, má vyšší kryoprotektivní účinky než sacharóza a silně působí na molekuly vody ve fosfolipidové vrstvě buněčné membrány (Salaj *et al.*, 2010). Trehalóza naproti sacharóze váže molekuly vody do karbonylové vazby. Dále má vyšší teplotu skelného přechodu než sacharóza.

Sacharóza je nejrozšířenější disacharid, skládá se z molekuly glukózy a fruktózy. Může být hydrolyticky štěpena glykosidázou – invertázou na levotočivou fruktózu a pravotočivou glukózu. Tyto translokované cukry jsou fotosynteticky metabolizovány v Calvinově cyklu. Vzhledem ke své molekulové velikosti jsou tyto sacharidy vhodnější pro transport na dlouhé vzdálenosti. Sacharóza je energeticky velmi bohatá (1 g sacharózy uvolní 16,7 kJ = 4 kcal energie), proto působí jako zdroj energie po odtání rostlin při heterotrofní výživě. Používané koncentrace sacharózy v procesu kryoprezervace se pohybují od 5 % (w/v) (Suzuki *et al.*, 2008) do 50 % (w/v) (Nishizawa *et al.*, 1993), nejčastěji se však aplikuje 40 % sacharóza (w/v) (Bhandari a Roos, 2003; Nishizawa *et al.*, 1993).

2.3.2 Kryoprezervace rostlinného materiálu

Konzervací genetických zdrojů rostlin se obecně rozumí uchování rostlin, respektive jejich částí v živém stavu, při zachování jejich původního genetického základu a regenerační schopnosti. K uchování genetických zdrojů rostlin slouží tzv. genové banky. Většina plodin je uchovávána ve skladech semen – v genových bankách – při teplotách mezi -15 a -20 °C. Některé semenné banky, zvláště v rozvojových zemích, z ekonomických důvodů nepoužívají takto nízké teploty a uchovávají semena při 0 až +4 °C (Keller *et al.*, 2006). Pro dlouhodobé uchování vegetativně množeného biologického materiálu při ultra-nízkých teplotách tekutého dusíku (-196 °C) se používá zařízení pro konzervaci genetických zdrojů rostlin, které se označuje jako kryobanka. Metody kryoprezervace rostlin jsou vhodné především u vegetativně množených druhů rostlin, a nebo druhů rostlin, které vytvářejí tzv. rekalcitrantní semena, u nichž klesá životnost při jejich vysušení a nelze je skladovat standardním způsobem. Pro bezpečné uchování vzorku v kryobance musí být rostlinný materiál podroben speciální přípravě pomocí tzv. kryoprotokolu, který spočívá v předkultivaci rostlin a následně správně zvolené metody kryoprezervace. Regenerace rostlin po kryoprezervaci je genotypově

závislá (Castillo *et al.*, 2010). Ukázalo se, že existují rozdíly v regeneraci nejen mezi druhy rostlin, ale i mezi jejich genotypy v rámci jednoho druhu (Condello *et al.*, 2009). Proto je důležitá správná volba metody pro úspěšnou kryoprezervaci rostlinného materiálu, kterou lze značně omezit ztráty genetických zdrojů rostlin a zachovat jejich biodiverzitu.

V konzervaci se u *in vitro* kultur s úspěchem využívá zpomaleného růstu rostlinných pletiv na vhodných médiích s regulátory růstu. Nevýhodou udržování rostlinných kultur v *in vitro* podmínkách je nutnost častého pasážování, kde může dojít nevhodnou manipulací ke ztrátě genotypu, nebezpečí genetické degradace v podobě somaklonální variability, dále je zde prostorová, časová a finanční náročnost při uchovávání rostlin. Vegetativně množené rostliny v *in vitro* kulturách mohou být konzervovány pomocí metod kryoprezervace v tekutém dusíku (Kim *et al.*, 2006b; Wolfe a Bryant, 2001). Materiál je v LN uchováván v kontrolovaných podmínkách ve sterilním prostředí v kryozkumavkách v Dewarových nádobách, které jsou naplněny tekutým dusíkem (Benson, 2008). Je nezbytné zajistit dostatečnou kontrolu hladiny dusíku uvnitř nádob, např. pomocí čidla, které zároveň monitoruje teplotu uvnitř nádoby. Takto zajištěné vzorky můžeme skladovat po velmi dlouhou dobu (odhaduje se po 50, 100 nebo 500 let) (Reed, 2008). Metoda dlouhodobého uchování rostlinného materiálu v tekutém dusíku, nebo-li kryoprezervace, je vhodnou metodou pro uchování genetické informace rostlin, poněvadž v důsledku této ultra-nízké teploty dochází k zastavení všech metabolických procesů a buněčného dělení (Matsumoto *et al.*, 2001; Reed, 2008; Sakai a Engelmann, 2007).

První kryoprezervovaná rostlinná pletiva byla uložena v 70. letech minulého století a počáteční testování krátkodobého skladování meristémů bramboru (1 rok), hrachu (2 roky) a jahod (10 let) neprokázalo ztráty životaschopnosti rostlin (Reed, 2008). V 80. letech se rozšířila tato metoda zamrazování meristemických vrcholů na více rostlinných druhů a došlo k rozvoji metod kryoprezervace. Následovalo rozhodnutí o výběru druhů, které budou skladovány, jejich počtu, počtu vzorků, umístění, testování životaschopnosti, zaznamenávání již skladovaných a patřičné kontroly jednotlivých skupin plodin. Postupně tak vznikaly menší soubory, zachovávající na základě podobného genetického, morfologického a agronomického popisu, co největší genetické spektrum výchozí kolekce, tzv. core kolekce rostlin v genových bankách (Benson, 2008; Rohrer *et al.*, 2008).

Nejčastější obtíže při kryoprezervaci vycházejí z toxicity, vysoké osmolarity a schopnosti průniku jednotlivých komponent vitrifikačních roztoků, které mají vliv na optimální dobu působení kryoprotektantu na rostlinné buňky. Nízké přežití a regenerace rostlin mohou být způsobeny také nedostatečným osmotickým přizpůsobením rostlinného

materiálu, nadměrným smrštěním buněk v hypertonickém prostředí, toxicitou vitrifikačního roztoku, nízkou schopností penetrace kryoprotektivní směsi do rostlinného vzorku nebo nedostatečnou dehydratací rostlinného pletiva a následnou tvorbou intracelulárních ledových krystalů při zamrazování. Při pomalém chlazení vzorku může dojít ke zmenšení povrchu buněk v důsledku ztrát na cytoplazmatické membráně a při návratu do normálního stavu potom k lyzi buněk (Kim *et al.*, 2006b). Toxicita kryoprotektivních látek může být spojena s denaturací proteinů, které nejsou ještě poškozeny ani nízkou teplotou, ani vysokou koncentrací kryoprotektantu potřebnou pro vitrifikaci rostlinných pletiv. Nejsilněji vitrifikují kryoprotektanty, které mohou vázat vodíkové vazby na molekuly vody, díky kterým dochází k vzájemnému působení vodíkových vazeb voda-voda, které jsou základem pro tvorbu ledu. Tyto kryoprotektivní látky mohou vázat vodíkové vazby na proteiny, čímž způsobují jejich denaturaci (Santarius a Franks, 1998). Snížení obsahu vody vázané na proteiny pomocí dehydratace může poškodit buňky. Vázaná voda však dovoluje dehydratovat a vitrifikovat buňky s vysokým obsahem proteinů bez použití kryoprotektivních látek.

Vývojem a výzkumem kryoprotektivních směsí s nízkou toxicitou a vysokou vitrifikační schopností se zabývali Fahy *et al.* (2004). Kvantifikovali toxicitu (4) jako funkci počtu molekul polárních skupin v závislosti na koncentraci potřebné pro vitrifikaci.

$$q = M_w/M_{pg} \quad (4)$$

kde q je koncentrace potřebná pro vitrifikaci, M_w je počet molů vody a M_{pg} je počet polárních skupin kryoprotektantu pronikajícího do buňky. Úroveň toxicity většiny používaných kryoprotektantů se pohybuje v rozmezí 2-4, například sloučenina DMSO má hodnotu 6.

Koncentraci, a tím také toxicitu, prostupujících látek do buňky můžeme redukovat pomocí neprostupných kryoprotektivních látek, kterými jsou molekuly s vysokou molekulární hmotností, polymery (PVP, PEG) nebo sacharóza. Tyto látky jsou příliš velké, nemohou se rozptýlit v buňce, ale mohou pomoci při vitrifikaci vody a inhibovat devitrifikaci v extracelulárním prostoru. Tyto kryoprotektivní látky pomáhají při dehydrataci buněk, odvádějí vodu z buňky do mezibuněčného prostoru a tím zvyšují vitrifikaci buněk.

Vlastní proces kryoprezervace může být ovlivněn také velikostí vzrostných vrcholů česneku. Pouze malá oblast meristematického vrcholu přežívá proces kryoprezervace. Velké buňky s velkými vakuolami a vysokým obsahem vody většinou nepřežijí mrznutí v tekutém dusíku (Volk a Caspersen, 2007). Příliš malé vzrostné vrcholy (1,5 x 3 mm) mají sice menší obsah vody v pletivech, ale jsou náchylnější na poškození při manipulaci. Naproti tomu příliš

velké vzrostné vrcholy (4,5 x 3 mm) mají vyšší obsah vody, je větší pravděpodobnost vzniku intracelulárních ledových krystalů a poškození vrcholu nízkou teplotou (Baek *et al.*, 2003).

Pro vlastní proces kryoprezervace a vyšší úroveň přežití je lepší používat apikální dóm rostlin (vrcholový meristém) nebo vzrostný vrchol než postranní pupeny. Apex má jednodušší velikost a zároveň je plně krytý jedním nebo dvěma primordiálními listy a bází listů. Toto pevné uspořádání v okolí vzrostného vrcholu pomáhá ochránit vlastní meristém před poškozením kryoprotektanty nebo nešetrnou manipulací (Baek *et al.*, 2003). Existuje několik druhů mechanismů, kterými jsou rostliny schopné bránit cytoplazmu před extrémními teplotami: izolace (při krátkodobé expozici vůči teplotě), zpožděná tvorba ledu v pletivech (rozpuštěné látky a jiné složky poutající vodu snižují bod mrazu), redukce tepla odrazem záření a ochlazováním při transpiraci (při nízkých teplotách). Toleranci vzrostných vrcholů rostlin k dehydrataci zvyšuje předkultivace rostlin, což je významný faktor pro úspěšnou kryoprezervaci pomocí metody vitrifikace (Niino *et al.*, 2007). V průběhu předkultivace na cukry obohaceném kultivačním médiu dochází ke zvýšení obsahu cukru, škrobu, prolinu a dalších ochranných látek ve vzrostných vrcholech, množství vody v buňkách klesá a centrální vakuola se dělí na více menších vakuol. Uvedené ochranné látky pomáhají zajišťovat stabilitu biomembrán a enzymů při následném odnímání vody dehydratací a tvorbou ledu (Fuller *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006b; Niino *et al.*, 2007).

Úspěšnost kryoprezervace je závislá na mnoha faktorech, především na druhu rostlinného materiálu a jeho fyzického stavu a kvalitě, zručnosti personálu, kultivačních podmínkách, předkultivaci rostlinného materiálu, metodě kryoprezervace, způsobu odtání a regenerační schopnosti rostlin.

2.3.3 Metody kryoprezervace

Vhodná konzervační technologie může významně přispět k zamezení ztrát genetických zdrojů a jejich ochraně před genetickou erozí, ke zvýšení kvality materiálů uchovávaných v genových bankách, k úsporám prostředků pro lepší hodnocení a využívání genetických zdrojů (Dotlačil, 1998). Mezi nejčastěji používané konzervační metody patří kryoprezervace a *in vitro* konzervace. Metody kryoprezervace se dají rozlišit podle způsobu mrznutí rostlinného materiálu na metody klasické a vitrifikační (Engelman, 2009). Při klasických metodách kryoprezervace dochází k tvorbě ledových krystalů. Jsou to metody,

kteřé jsou založené na přirozené mrazuvzdornosti rostlin a schopnosti tolerance tvorby ledových krystalů.

Od poloviny 80. let minulého století došlo k rozvoji různých kryoprezervačních metod (Kami *et al.*, 2009) s použitím různého rostlinného materiálu, které můžeme rozdělit do několika hlavních skupin: kryoprezervační metody, které využívají pomalé, dvoustupňové mrznutí; metoda vitrifikace; metoda enkapsulace-vitrifikace; metody ultra-rychlého mrznutí a kombinace výše jmenovaných metod.

Metoda kryoprezervace využívající **pomalé, dvoustupňové mrznutí** (anglická synonyma: Controlled Freezing, Slow Freezing, Two-Step Freezing) patří mezi klasické metody kryoprezervace. Rostlinné vzorky meristematičké pletiv jsou předem upraveny pomocí kryoprotektivních látek např. PEG (10% polyethylenglykol 1 000), 10% sacharóza, 10% DMSO. Vzorky jsou potom zamrazovány rychlostí menší než $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně jsou ponořeny do tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), kde dochází k prudkému ochlazení (Reed, 2008). V průběhu pomalého řízeného mrznutí (do $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), kterému předchází iniciace nukleace, se koncentrované intracelulární a extracelulární rozpuštěné látky formují v extracelulární ledové krystaly a dochází k odtoku vody z buněk a postupné dehydrataci. Poškození může vznikat buď toxicitou rozpuštěných látek nebo nadměrným smrštěním buněk v hypertonickém prostředí. Buňka musí obsahovat určité kritické minimální množství vody, která nesmí být odebrána, jinak dojde k jejímu poškození. Stejně tak povrch buňky se může zmenšit v důsledku ztrát na cytoplazmatické membráně při pomalém chlazení a při návratu do normálního stavu pak může dojít k lýze buněk (Hirai *et al.*, 1998). Obsah vody se v závislosti na čase a teplotě snižuje, přičemž nejvyšší ztráty jsou během prvních 24 hodin. Při rychlém chlazení dochází k formování extracelulárního ledu a koncentrování rozpuštěných látek mnohem rychleji, než působí osmotický tlak na buňku. To způsobí podchlazení cytoplazmy a možnost intracelulární ledové nukleace, což může mít pro rostlinou buňku letální následky (Sablani *et al.*, 2010). Voda v přítomnosti iniciačního jádra mrzne extracelulárně a tvoří se krystalky čistého ledu. Spontánní nukleace je závislá na struktuře pletiva. V procesu tání dochází k opačnému pohybu vody než při mrznutí, tedy zpět do buňky, a to v důsledku rozdílu parciálního tlaku vodní páry nad extracelulárním ledem (Mishima a Stanley, 1998).

Se vzrůstající rychlostí mrazení z 1 do $2,9\text{ }^{\circ}\text{C hod}^{-1}$ dochází ke zvýšení rozdílu mezi přežitím buňky a odumřením buňky. Změna v přenosu látek buněčnou membránou je jedním z prvních projevů mrazového poškození. Tyto změny se mohou objevit při činnosti

v souvislosti s ATP-ázou cytoplazmatické membrány a nikoli s lipidovou membránou (Palta, 1989; Sugawara a Takeuchi, 1997).

Nejefektivnější metody kryoprezervace, které se v současnosti používají, jsou metody založené na **vitrifikaci**, schopnosti rostlin tvořit amorfní hmotu (sklo), neboli tvorbě tzv. biologického skla. Jedná se o modernější metody zamrazování rostlinného materiálu, kde v důsledku vysokého snížení obsahu vody a rychlého mrznutí rostlinného materiálu nevznikají ledové krystaly (Matsumoto *et al.*, 2001). Za výše uvedených okolností dochází k tvorbě skla, ve kterém se zastavují všechny procesy. Při těchto metodách se využívá částečné dehydratace pletiv a prudkého poklesu teploty, které vedou k tvorbě biologického skla. Nedochází přitom ke vzniku nebezpečných intracelulárních ledových krystalů, které by letálně poškodily rostlinné buňky. Sklo je z termodynamického pohledu považováno za vysoce viskózní kapalinu nebo taveninu. Tento stav je předpokladem pro zachování genetické stability kryoprezervovaného rostlinného materiálu a je proto vhodný pro jeho dlouhodobé uchování. Metoda vitrifikace, rychlého mrznutí (z angl. Rapid Cooling) využívá působení kryoprotektivních látek, především pak PVS2 nebo PVS3 a další, před vlastním ponořením rostlinného materiálu v kryozkumavkách do tekutého dusíku (Benson, 2008; Reed, 2008; Sakai a Engelmann, 2007). Mikroskopické pozorování meristematických pletiv ukazují na velká poškození buněk v průběhu mrznutí a odtávání nebo při osmotické dehydrataci s použitím vitrifikačního roztoku PVS2 (Ding *et al.*, 2008).

Další metodou ultra-rychlého mrznutí pro dosažení skelného stavu je tzv. **kapková metoda** (z angl. Droplet Method), vznikla úpravou předchozí metody, kdy je vzrostný vrchol rostliny předem ošetřen kryoprotektivním roztokem, který obsahuje pouze poměrně nízkou koncentraci dimethylsulfoxidu (DMSO) – kolem 10 %. V dalším kroku se vzrostný vrchol umístí na hliníkový plíšek s kapkou kryoprotektantu a je rychle zamrazen ponořením do tekutého dusíku (Schafer-Menuhr *et al.*, 1996). Použití hliníkové fólie umožňuje snadné a rychlé zamrazení více vzrostných vrcholů najednou, její další předností je, že je dobrým vodičem tepla, což je důležité pro rychlé zamrazení a tání vzorků. Kombinací kapkové metody a metody vitrifikační vznikla metoda kapková-vitrifikační, kdy je postup obdobný jako při kapkové metodě, ale je použit silně koncentrovaný kryoprotektivní roztok (Kim *et al.*, 2006b; Schafer-Menuhr *et al.*, 1996).

Výše jmenované metody je možné mezi sebou kombinovat; příkladem takové kombinace může být **enkapsulace-vitrifikace**, kdy se rostlinné vzorky obalí alginátem sodným a pomocí vitrifikačního roztoku se ze vzorků odstraňuje voda proudem vzduchu

(Reed, 2008; Sakai a Engelmann, 2007). V průběhu dehydratace vzorků dochází ke stabilizaci buněčných membrán (Hirai *et al.*, 1998). Dehydratované vzorky se pak zamrazují rychlým ponořením do ultra-nízkých teplot tekutého dusíku (González-Benito *et al.*, 2004; Kami *et al.*, 2009; Keller, 2005). Algináty jsou známy pro jejich schopnost tvorby gelu vytvářením řetězových shluků molekul při reakci se skupinou prvků s dvojmocnými kationy (Santarius, 1990). Molekuly vody v systému voda – sacharidy můžeme rozdělit do tří skupin: nemrzoucí voda (NFW, z angl. Non-Freezing Water), mrznoucí vázaná voda (FBW, z angl. Freezing Bound Water) a mrznoucí volně vázaná voda (FFW, z angl. Freely-Freezing Water). NFW je voda pevně vázaná na molekuly sacharidů, nemůže krystalizovat; FBW je voda slabě vázaná na molekuly sacharidů, může krystalizovat, ale bod tání je nižší než u čisté vody; FFW není vázána na molekuly sacharidů, její fyzikální vlastnosti jsou pak stejné jako u čisté vody (Bellich *et al.*, 2009). Carpentier *et al.* (2003) sledovali termodynamické a molekulární vlastnosti cukerných alkoholů jako podchlazené kapaliny, kde byly prokázány odlišné schopnosti v rychlosti krystalizace těchto látek.

Metody kryoprezervace můžeme rozdělit také podle rychlosti mrznutí vzorků na metody pomalého mrznutí, rychlého mrznutí a ultra-rychlého mrznutí. **Metoda pomalého mrznutí** (řízené, dvoustupňové mrznutí) spočívá ve dvou stupních mrznutí vzorku. Nejprve se vzorek zamrazí na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a potom se ponoří do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tekutého dusíku.

Při metodě **rychlého mrznutí**, pokud jsou buňky dostatečně dehydratovány, zapříčiní rychlé ponoření do tekutého dusíku vznik tzv. biologického skla, bez krystalizace a bez poškození samotnou ultra-nízkou teplotou (Kobayashi *et al.*, 2005); uvnitř vzorku dojde k rychlému poklesu teploty (řádově stovky $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) (Fahy *et al.*, 1984). Kryoprezervace biologických tkání a pletiv může být úspěšná pouze bez vzniku intracelulárních ledových krystalů, které mohou způsobit nenávratné poškození buněčných membrán a tímto zničit jejich semipermeabilitu (Panis *et al.*, 2005).

Metoda **ultra-rychlého mrznutí** spočívá v použití velmi malých vzorků ošetřených kryoprotektivním roztokem (Kim *et al.*, 2004b), které se vkládají přímo do tekutého dusíku. Zde dochází k velmi rychlému mrznutí vzorku (řádově tisíce $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) (Reed, 2008; Wolfe a Bryant, 2001).

Metoda zamrazování nedozrálých pacibulek (topset) má několik výhod, jsou méně zavirované oproti zralým, snadněji se převádějí do *in vitro* podmínek, výtěžnost z jednoho topsetu je kolem 20 rostlin, což je víc, než je stroužků v cibuli česneku (Kim *et al.*, 2007).

Kryoprezervace vzrostných vrcholů nabízí možnost dlouhodobého skladování, maximální stabilitu fenotypových a genotypových charakteristik skladovaných druhů rostlin, zároveň vyžaduje minimální prostory nutné pro skladování a zachování zásob (Ding *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2001). Klíč k úspěšné kryoprezervaci leží spíše v toleranci rostlin k dehydrataci než v toleranci k samotnému procesu zamrazování. Některé kryoprotektivní látky mohou být po delší době působení na rostlinná pletiva toxická, proto je nutné při zamrazování přesně dodržovat kryoprotokol. Při dehydrataci vzorku může dojít k nízkému odejmutí vody z pletiv a poškození buněk při zamrazení.

V oboru lékařství je v dnešní době velký zájem o kryoprezervační metody; Ebertz a McGann (2004) popisují propustnost vody a kryoprotektantů na biologické membráně lidské rohovky. Podobné principy zchlazování biologických pletiv lze využít také v biologii rostlin. Wolfe a Bryant (2001) se ve své práci zabývají vlastnostmi biologických membrán v závislosti na hydrataci a teplotě. Podle stupně hydratace membrány a uspořádání uhlovodíkových řetězců rozlišují tekutou krystalickou fázi při vysoké hydrataci; gelovou fázi při nízké hydrataci, kde dochází k tloušťnutí; a invertní fázi při velmi nízké hydrataci, kdy se molekuly lipidů v roztoku seskupují do hexagonální soustavy, podobně jako voda. Takováto soustava je stabilní pro širokou škálu teplot. Ve struktuře krystalu vznikají volné prostory a jeho uspořádání je rozvolněnější než v kapalném stavu, to je důvodem menší objemové hustoty ledu (Wolfe a Bryant, 2001).

Odtávání vzorků probíhá obvykle ve 40 °C sterilní vodní lázni po dobu 1–2 minut. V případě použití fytotoxického DMSO se po teplé vodní lázni vymývá kryoprotektivní směs sestupnou řadou sacharózových nebo sorbitolových roztoků. Stanovení úrovně přežití a regenerace rostlin probíhá a) vizuálním hodnocením rostoucích rostlin v *in vitro* podmínkách a vyjádřením příslušného podílu k celkovému počtu rostlin (Sakai, 1965); b) pomocí techniky barvení TTC (triphenyltetrazoliumchlorid), kdy červené zbarvení pletiv znamená živá pletiva (Steponkus a Lanphear, 1967); c) pomocí výtoku elektrolytu (MEL, z angl. meristem elektrolyte leakage), který vzniká jako následek poškození buněčné membrány (Grout, 1995).

2.3.4 Metody termické analýzy

Diferenční skenovací kalorimetrie jsou navrženy k měření entalpií tepelných procesů pomocí diferenciálního tepelného toku neboli porovnání referenčního vzorku a měřeného vzorku při stejné teplotě. Tyto metody lze rozdělit do několika skupin, podle toho, kterému

teplotnímu profilu jsou vzorky rostlin vystaveny: diferenční termická analýza (DTA, z angl. Differential Thermal Analysis), standardní metoda DSC (z angl. Differential Scanning Calorimetry), tepelná gravimetrická analýza (TGA, z angl. Thermal Gravimetric Analysis), teplota modulovaného diferenčního skenovacího kalorimetru (TMDSC, z angl. Temperature Modulated Differential Scanning Calorimetry), kvazi-izotermická teplota modulovaného diferenčního skenovacího kalorimetru (QITMDSC, z angl. Quasi-Iso Temperature Modulated Differential Scanning Calorimetry)(Zámečník *et al.*, 2009).

Analýza DTA je termoanalytická metoda stejně jako DSC, rozdíl je v tom, že při této analýze se neporovnává množství energie (tepla), ale teplotní rozdíl vzorku a referenčního (inertního) vzorku v čase nebo proti teplotě, kdy je vzorek zahříván konstantní rychlostí. Analýza teplotní změny v čase je zpravidla spojena s fyzikálními pochody ve vzorku, kterými jsou např. dehydratace, vypařování, dále je využívána pro měření teplot přechodů (tání, skelný přechod, krystalizace), entalpie tání, stupeň krystalinity (Sorai a Gakkai, 2004).

Standardní metoda DSC využívá rostlinný vzorek, který je vystaven lineární změně (snížení nebo zvýšení) teploty, kdy rychlost tepelného toku do vzorku je úměrná jeho měrné tepelné kapacitě (při rychlosti průtoku tepla jako teplotní funkci) a jeho porovnání se standardním vzorkem za stejných podmínek. Na vzniklých křivkách vzorku pozorujeme velmi přesné měření přenosu tepelné energie. Metoda měření je založena na principu porovnávání rozdílných teplot, teploty prázdné referenční hliníkové pánvičky a teploty hliníkové pánvičky se vzorkem, které jsou vystaveny řízenému chlazení nebo ohřevu (Benson, 2008). Pomocí této metody lze charakterizovat exotermické a endotermické vlastnosti a změny tepelné kapacity, např. teplotu skelného přechodu (T_g), teplotu nukleace ledu a tání, teplotu mrznutí, tání a varu, množství zmrzlé vody, specifickou tepelnou kapacitu nebo teplotní stabilitu (Gonzalez-Benito *et al.*, 2007). Metoda DSC pro stanovení měrné tepelné kapacity je schopna detekovat takové změny tepelné kapacity, které jsou typické pro skelný přechod (Zámečník *et al.*, 2009).

Analýza pomocí TGA je založena na tepelné vážkové analýze vzorků, která určuje změny v hmotnosti vzorku vztahované k teplotě. Analýza umožňuje velmi přesné stanovení inflexních bodů. TGA je vhodným nástrojem ke stanovení složení a čistoty látky ve směsi nebo pro stanovení vlastností materiálů (Ramiah, 1970).

Metoda TMDSC je založena na současném měření tepelné kapacity vzorku, s cílem získat stejné informace ve stejném čase jako standardní DSC, pomocí definované rychlosti ohřevu sinusovou teplotní modulací s jednou nebo více frekvencemi, a jejich srovnání. Pro vzorek se používá inertní látka, mezi teplotním snímačem vzorku a středem vzorku nejsou

žádné významné teplotní gradienty. Je obecně známo, že teplota skelného přechodu je často závislá na dynamickém, mechanickém a dielektrickém měření. Tyto závislosti byly pozorovány také v TMDSC (Wunderlich, 2006). Při chlazení během TMDSC jsou nejdůležitějšími parametry: rychlosti chlazení, kmitočet (frekvence modulace) a amplituda teplotní modulace (Zámečník *et al.*, 2009).

Při kvazi-izotermické metodě (QITMDSC) je základní rychlostí ohřevu nula a teplota osciluje kolem nastavené konstantní teploty. Pokud je amplituda modulace nízká (0,01 až 0,5 °C), je teplota téměř konstantní. Výhodou této metody je snazší možnost určení tepelné kapacity (Wunderlich, 2006).

James *et al.* (2009) pomocí termické analýzy zjistili, že stroužky česneku nemusejí být při -6 °C vždy ve zmrzlém stavu, protože při stálých podmínkách (-6 až -9 °C) vydrží oloupané stroužky česneku až 69 hodin bez zmrznutí. Termickou analýzu využívají ke srovnání účinku odlišných kryoprotektantů v časových intervalech ve své práci také Kim *et al.* (2006b). Metody termické analýzy umožňují zjistit např. poškození buněk mrazením či vznik ledových krystalů a biologického skla, které jsou důležité z pohledu uchování a regenerace genetických zdrojů v kryobankách.

3 Cíl práce a vědecké hypotézy

Cíl 1. Charakterizovat vnější a vnitřní podmínky působící na fyziologické vlastnosti rostlin česneku.

- Hypotézy:
- a. Lze úpravou vnějších podmínek ovlivnit fyziologické vlastnosti česneku tak, aby rostliny měly vysokou regeneraci po kryoprezervaci.
 - b. Lze teplotou během předkultivace rostlin zvýšit regeneraci po kryoprezervaci.
 - c. Lze prokázat rozdíl v odolnosti rostlin vůči mrazu mezi otuženými a neotuženými explantáty česneku.
 - d. Lze teplotou ovlivnit délku dormance pacibulek.

Cíl 2. Optimalizovat fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů a na základě růstové analýzy kvantifikovat délku subkultivace rostlin česneku v *in vitro* podmínkách.

- Hypotézy:
- a. Lze stanovit limity zdrojů pro růst rostlin v *in vitro* podmínkách pomocí růstové analýzy.
 - b. Lze zvýšit multiplikační koeficient rostlin česneku pomocí mechanické nebo hormonální stimulace meristematického pletiva.
 - c. Lze snížit ztráty rostlin způsobené hyperhydratací během regenerace po kryoprezervaci.

Cíl 3. Optimalizace složení a koncentrace kryoprotektivních látek na základě termické analýzy pro zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci.

- Hypotézy:
- a. Lze zvýšit regeneraci rostlin česneku složením a koncentrací kryoprotektivních látek.
 - b. Lze optimalizovat složení a koncentraci kryoprotektivních látek termickou analýzou.

4 Materiál a metody

Materiál pro doktorskou práci byl zajištěn z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Olomouci-Holice, kde je uchovávána mezinárodní kolekce vegetativně množených dlouhodobých druhů *Allium sativum* L. Přednostně byly použity rostliny česneku s dobrou regenerační schopností, pěstované v ČR.

Experimentální práce byla provedena v kryolaboratoři Oddělení molekulární biologie Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, která je pro tento typ experimentů vybavena vhodným zařízením a přístroji.

4.1 Rostlinný materiál

Pokusný materiál byl vybrán z databáze EVIGEZ (Anon.2, 2007) – Evidence genetických zdrojů rostlin ČR, skupiny plodin zelenin, rodu *Allium*, čítající 801 genotypů, z toho česneků je 656 položek. Pro experimentální část práce byl přednostně vybrán druh uchovávaný v České republice z polní kolekce VÚRV, v.v.i. v Olomouci, a to druh *Allium sativum* L.

Modelovým materiálem pro experimentální část práce byla odrůda česneku AS88 Djambul2 – krajový kultivar (Obr. 4), sklizený v polovině srpna, který byl převeden z pěstované polní kultury do řízených podmínek *in vitro*. Tato odrůda pochází z bývalého Sovětského svazu, dle taxonomického zařazení patří do skupiny *Allium sativum* L. *Sativum* Group, dle typu je řazena jako ozimý širokolistý paličák. Je zapsán v Listině povolených odrůd. Do kolekce genobanky v Olomouci byla zařazena roku 1988 pod evidenčním číslem 1353 – řazení v databázi EVIGEZ, databáze IPGRI (Řím) je označena 09H0100533. Průměrná hmotnost 100 pacibulek po červencové sklizni je 6,9 g. Výška porostu je 0,41–0,50 m. Rostlina má 5–9 zeleně zbarvených vzpřímených listů. Obalové suknicice mají smetanovou barvu. Tvar cibule je kulovitý. Cibule má 10–12 dobře vyvinutých, fialově zbarvených stroužků. Stroužky jsou rozmístěny pravidelně okolo květního stvolu. Je velmi výnosný. Při produkci sadby se vychází z bezvirózního materiálu. Chuť je příjemná, ostrá, ušlechtilá.



Obrázek 4. Pacibulky ozimého paličáku genotypu Djambul2 ze skupiny *Allium sativum* L. *Sativum* Group, velikost pacibulek (foto autor).

Mezi srovnávací rostlinný materiál byly zařazeny pacibulky genotypů Ropal, Unikát, Dukát, 372K a 368K. Genotyp Ropal (Obr. 5) podle taxonomického zařazení patří do skupiny *Allium sativum* L. *Ophioscorodon* Group, typově je řazen jako ozimý paličák. Cibule jsou kulovité, barva vnějších suknic je smetanově bílá, stroužky jsou bílé. Je také zapsán v Listině povolených odrůd. V databázi EVIGEZ se nachází pod číslem 1058, označení podle IPGRI je 09H0100081. Průměrná hmotnost 100 pacibulek po sklizni je 12,4 g. Jde o velmi výnosný genotyp s dobrou skladovatelností. Chuť je příjemná, jemně ostrá, ušlechtilá.



Obrázek 5. Pacibulky ozimého paličáku genotypu Ropal ze skupiny *Allium sativum* L. *Ophioscorodon* Group, velikost pacibulek (foto autor).

Dalším srovnávacím genotypem použitým v této práci byl typ raného ozimého paličáku Unikát (Obr. 6), který je taxonomicky řazen do skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, s označením 09H0100538 podle IPGRI. Hmotnost pacibulek po sklizni je v průměru 6,2 g. Barva vnějších suknic je šedá, barva stroužků je fialová. Cibule má 8–13 středně velkých stroužků. Genotyp je vhodný pro průmyslové zpracování a pro přímý konzum.



Obrázek 6. Pacibulky ozimého paličáku genotypu Unikát ze skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, velikost pacibulek (foto autor).

Genotyp Dukát (Obr. 7) patří do stejné skupiny jako Unikát, tedy *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, řazený v databázi EVIGEZ jako 2853 a podle IPGRI 09H0100542. Jedná se o poloraný paličák vhodný pro podzimní výsadby. Hmotnost pacibulek po sklizni je v průměru 5,9 g. Cibule jsou velké, kulovité, základní barva vnějších suknic je bílá. Stroužky jsou velké, obsahují vysoký podíl silic, počet stroužků v cibuli je 5–7 ks. Tento genotyp je vysoce tolerantní proti virózám, má vynikající skladovatelnost, při vhodných podmínkách vydrží až do nové sklizně. Genotypy Unikát a Dukát patří mezi české uznané odrůdy, které jsou zapsány v Listině povolených odrůd.



Obrázek 7. Pacibulky ozimého paličáku genotypu Dukát ze skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, velikost pacibulek (foto autor).

Genotyp 368K (Obr. 8) je ozimý paličák *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, původem z Polska. V databázi IPGRI je zařazen pod označením POL030225706. Hmotnost 100 pacibulek je 5,3 g. Cibule jsou pravidelného tvaru, jemně fialové, tvoří kolem 10 stroužků. Pacibulky byly poskytnuty v rámci projektu EURALLIVEG z polské kolekce *Allium sativum*, RIVC, Skierniewice.



Obrázek 8. Pacibulky ozimého paličáku genotypu 368K ze skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, velikost pacibulek (foto autor).

Genotyp 372K (Obr. 9) patří mezi ozimé paličáky do skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, původem pochází z Polska. Průměrná hmotnost 100 pacibulek je 5,6 g. Vytváří středně velké kulovité cibule. Základní barva obalových suknic je bílá. Uspořádání stroužků v cibuli je nepravidelné, jejich počet je 7–11. Podle databáze IPGRI má označení POL030225710. Tyto pacibulky byly poskytnuty rovněž v rámci projektu EURALLIVEG z polské kolekce *Allium sativum*, RIVC, Skierniewice.



Obrázek 9. Pacibulky ozimého paličáku genotypu 372K ze skupiny *Allium sativum* L. *Longicuspis* Group, velikost pacibulek (foto autor).

4.1.1 Příprava rostlinného materiálu a kultivačního média

Byly použity meristemické části rostlin druhu *Allium sativum*, které byly převedeny z pěstované polní kultury do řízených podmínek *in vitro*. Pacibulky byly povrchově sterilizovány 2% roztokem Isothiazolinone (5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one), poté z nich byly ve sterilním laminárním boxu vyjmuty vzrostné vrcholy, které se ponořily na 1-2 s do 75% etylalkoholu a dále do 1% sterilizačního roztoku Isothiazolinone. Po 15 minutách byly vzrostné vrcholy přeneseny na modifikované kultivační médium MS (Murashige and Skoog, 1962) s obsahem fytohormonů 0,02 mg l⁻¹ NAA a 0,2 mg l⁻¹ BAP. Pokusné rostliny byly kultivovány v řízených podmínkách *in vitro*. Teplotní rozmezí bylo stanoveno pro otužování rostlin na 2 ± 1 °C, pro vlastní kultivaci explantátů potom na 20 ± 1 °C. Relativní vzdušná vlhkost v kultivačních nádobách byla 100 %. Intenzita ozáření v kultivační místnosti byla nastavena na 100 mmol m⁻² s⁻¹ s dlouhou fotoperiodou, tj. 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Počet opakování pokusů byl stanoven na základě předpokusů, ze kterých byl statisticky stanoven minimální počet třech opakování. Dosažené výsledky z následných experimentů byly statisticky vyhodnoceny a na základě statistické analýzy bylo možné zamítnout nebo potvrdit nulové hypotézy na hladině významnosti $P \geq 0,05$.

4.2 Metodika

4.2.1 Vliv podmínek působících na fyziologické vlastnosti *Allium sativum*

Rychlost růstu: Vzrostlé rostliny byly zkráceny a přesazeny na čerstvé kultivační MS médium. Každý týden bylo prováděno měření celkové délky u jednotlivých rostlin po dobu osmi týdnů. Z rostlin česneku kultivovaných v *in vitro* podmínkách byla vážením stanovena hmotnost sušiny listů, vypočtena listová plocha rostlin a obsah vody vztažený na čerstvou hmotnost. Rostlinný materiál byl sušen v sušárně při 85 °C do konstantní hmotnosti. Ze získaných hodnot byl proveden výpočet rychlosti růstu rostlin v *in vitro* podmínkách.

Vliv sacharózy na růst rostlin: Předem napěstované rostliny česneku v *in vitro* podmínkách byly zkráceny a přesazeny na čerstvé kultivační médium s pěti různými koncentracemi sacharózy v médiu (0-15-30-60-120 g sacharózy na 1 l média) při teplotě 20 ± 1 °C. Byl pozorován růst genotypů (Djambul2, Unikát, Dukát) v časové periodě 7 týdnů, která odpovídá délce jedné subkultivace.

Rozdílná teplota kultivace (20 a 5 °C) a její vliv na rychlost růstu: Byly pozorovány tři genotypy rostlin česneku (Djambul2, Unikát, Dukát), které byly kultivovány při různých teplotách (5 a 20 ± 1 °C). Po dobu 6 týdnů byla sledována rychlost růstu jednotlivých genotypů v závislosti na dané teplotě. Rostliny byly měřeny od podpučí po špičku nejdelšího listu.

Odolnost rostlin vůči mrazu: Z pacibulek česneku byly vyjmuty vzrostné vrcholy, které byly po dobu 4 týdnů kultivovány při teplotě 20 ± 1 °C v Erlenmayerových baňkách. Poté byly listy rostlin zkráceny na 5 mm a explantáty byly přeneseny po třech do zkumavek. Zkumavky byly umístěny do kultivační místnosti s kolísavou teplotou 20 ± 1 °C ve dne a 2 ± 1 °C v noci (16/8 den/noc) a to po dobu 1 až 16 týdnů. V každém týdnu byl proveden odběr na mrazové testy. Podchlazení a nukleace byly provedeny ponořením spodní části zkumavky do tekutého dusíku, kdy došlo k rychlému ochlazení kultivačního média, iniciaci tvorby ledových krystalů v médiu a podchlazení báze rostliny. Zkumavky byly umístěny do vychlazené lihové lázně (-3 °C). Bylo stanoveno 15 teplot (0, -3, -5, -7, -9, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -20, -23 °C), při kterých byly podchlazené a nukleované zkumavky vyjímány z lihové lázně ultra-kryomatu RUK 50 (MGW LAUDA, Německo) (Obr. 10).



Obrázek 10. Lihová lázeň ultra-kryomatu RUK 50 (MGW LAUDA, Německo). Podchlazené a nukleované zkumavky s rostlinným materiálem jsou vystaveny nízkým teplotám mrazového testu (foto autor).

Po zásahu byly zkumavky s explantáty umístěny na dobu 2 hodin do ledové lázně o teplotě 0 °C. Poté byly listy rostlin opět zkráceny na délku 5 mm a explantáty byly kultivovány při teplotě 20 ± 1 °C po dobu 4 týdnů. Následně byla vyhodnocena regenerace rostlin a stanovena jejich sušina sušením v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Pro stanovení odolnosti rostlin česneku vůči mrazu pomocí konduktometrie byly listy explantátů po zásahu zkráceny na délku 5 mm a vzorky byly umístěny do zkumavek s 1 ml destilované vody a třepány po dobu 3 hodin na třepače ($115 \text{ otáček min}^{-1}$). Poté následovalo první měření vodivosti elektrolytů konduktometrem Conductometer 03 (Skála Brno, ČSFR), opakované měření vzorků proběhlo po 24 hodinách. Zkumavky byly potom krátce povařeny (10 min) a po 1 hodině třepání byla opět měřena vodivost elektrolytů. Poslední měření proběhlo po dalších 3 hodinách třepání. Z hodnot naměřené vodivosti byly vypočteny hodnoty kritické teploty a hodnoty LT_{50} (Janáček a Prášil, 1991).

Dormance pacibulek: Po sklizni (první týden v srpnu) byly pacibulky česneku skladovány v suché vzdušné místnosti po dobu 5 týdnů. Poté byly odebrány vzorky pacibulek a umístěny do kultivačních boxů s teplotou +4, +20, +30 °C. Dvakrát v týdnu byly vysazovány pacibulky do rašelinového substrátu (Zahradnický substrát A, pro výsev, množení a řízkování; Rašelina Soběslav; 70 l, plněno podle EN12580; číslo rozhodnutí o registraci: 0307, PN č. 43, SKP 10.3; složení: N 50-300 mg l⁻¹, P₂O₅ 80-300 mg l⁻¹, K₂O 80-400 mg l⁻¹, pH 5,0-6,5; zrnitost ≤ 20 mm) v počtu 20 rostlin na jednu výsadbu pro každou teplotu (Obr. 11). Kultivační nádoby (mini pařík, měkký plast bílý, spodní část: 18 x 45 x 5 cm) byly umístěny do kultivační místnosti (20 °C). Zálivka byla provedena 1 l vody na 1 kultivační nádobu, a to dvakrát za týden. Hodnocení růstu bylo provedeno vizuálně, součtem rostoucích rostlin po 14 dnech kultivace.



Obrázek 11. Kultivace pacibulek *Allium sativum* L. v rašelinovém substrátu v klimatizované kultivační místnosti při teplotě 20 °C (foto autor).

Ve stejnou dobu byl proveden odběr pacibulek (5 ks) do injekčních stříkaček na stanovení osmotického potenciálu, stříkačky se vzorky byly umístěny do mrazáku (-18 °C). Po ukončení všech odběrů následovalo měření osmotického potenciálu z vylisovaných buněčných šťáv pacibulek pomocí přístroje psychrometr/hygrometr HR-33T (Wescor, UT, USA) (Obr. 12). Princip měření osmotického potenciálu spočívá v použití speciálního termočláňkového psychrometrického přístroje s citlivým mikrovoltmetrem, který umožňuje snadné stanovení osmotického potenciálu rostlinného pletiva či roztoků metodou rosného bodu. Po vložení vzorku do měřicí komůrky dojde po určité době k ustálení hodnoty tlaku vodní páry nad vzorkem, oproti tlaku nasycené vodní páry vzorku. Termočláňkem prochází proud, který sníží teplotu v měřicí komůrce a dojde ke kondenzaci vodní páry. To je okamžik, kdy má povrch termočláňkového spoje teplotu rosného bodu, tím stanovíme tlak vodní páry, suchým termočláňkem změříme teplotu vzduchu. Naměřená data vypočteme podle kalibračních křivek různých molarit kalibračních roztoků NaCl (0,1-0,2-0,4-0,5-0,8-1,0 M NaCl). Zároveň byly odebírány pacibulky pro stanovení obsahu vody (20 ks) a sušeny v sušárně při 80 °C do konstantní hmotnosti.



Obrázek 12. Měření osmotického potenciálu z vylisovaných buněčných šťáv pacibulek pomocí přístroje Wescor HR-33T (UT, USA) (foto autor).

4.2.2 Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů

Růstová analýza: Byl sledován genotyp česneku (Djambul2) rostoucí *in vitro* podmínkách po dobu šesti týdnů. V každém týdnu byl proveden odběr rostlinného materiálu, byla stanovena čerstvá hmotnost rostlin a jejich sušina. Rostlinný materiál byl naskenován a pomocí analýzy obrazu (SW ImageJ 1.38x) byla stanovena plocha listu. Tvar listu byl oválně zploštělý. Podle vzorců pro stanovení růstových charakteristik byly provedeny výpočty čistého výkonu asimilace (NAR), relativní rychlost růstu sušiny (RGR RW), relativní rychlost růstu asimilační plochy (RGR RA), rychlost tvorby sušiny (C), pokryvnost listová (LAI), integrální listová plocha (LAD). Pro výpočet růstových charakteristik byly použity vzorce $LAR = A/W$; $LAD = [(A_2 - A_1)/(\ln A_2 - \ln A_1)] (t_2 - t_1)$; $C = [(W_2 - W_1)/(t_2 - t_1)] 1/P$; $RGR RW = (\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1) 100$; $RGR RA = (\ln A_2 - \ln A_1)/(t_2 - t_1) 100$; $NAR = [(\ln A_2 - \ln A_1)/(t_2 - t_1)] [(W_2 - W_1)/(A_2 - A_1)]$; kde A je listová plocha, W je hmotnost sušiny, P je plocha pozemku, t je čas měřený na dny, indexy 1 a 2 jsou hodnoty prvního a posledního odběru (Evans, 1972; Hunt *et al.*, 2002; Lambers *et al.*, 2008).

Multiplikace rostlin *Allium sativum*: Metoda multiplikace rostlin pomocí mechanické stimulace spočívá ve 4 týdenním předpěstování rostlin česneku na MS médiu s obsahem růstových regulátorů NAA a BAP. Poté byly rostliny zkráceny na délku 5 mm a nařezávány

odlišnými způsoby, aby došlo k mechanické stimulaci apikálního vrcholu a podpučí. Varianty mechanické stimulace jsou popsány: celá rostlina – standardně umístěná rostlina na kultivační médium, kontrolní rostlina; položená – položený vzrostlý vrchol česneku na kultivační médium; polovina – rozdělená rostlina na dvě podélné poloviny; 1/2 podpučí – naříznuté podpučí na 2 poloviny; 1/2 shora – naříznutý vzrostlý vrchol česneku shora explantátu; čtvrtina – podélně rozdělená rostlina na čtyři díly; 1/4 podpučí – naříznuté podpučí na čtvrtiny; 1/4 shora – naříznutý vzrostlý vrchol česneku na čtvrtiny; dokola – 5–6x naříznuté podpučí po okraji.

Kultivační média byla za účelem testování vyššího koeficientu multiplikace upravena různými růstovými regulátory a jejich vzájemnými kombinacemi. Z růstových regulátorů byly použity NAA a BAP, dodané renomovanými firmami Duchefa, Penta, Sigma-Aldrich. Koncentrační řada růstových regulátorů pro předpokus byla zvolena podle stoupajícího logaritmického trendu (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mol l⁻¹) a kombinace růstových regulátorů byla zvolena podle křížového pravidla. Z pacibulek česneku byly extirpovány apikální meristémy, které byly po sterilizaci přeneseny na kultivační médium s růstovými regulátory. Na základě vyhodnocení výsledků vlivu koncentrací na tvorbu nových rostlin byly stanoveny následující koncentrace pro experimenty (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 mol l⁻¹).

V obou případech multiplikace bylo provedeno vyhodnocení růstu a počtu nových rostlin pro stanovení multiplikačního koeficientu po 6 týdenní kultivaci v klimaboxu při teplotě 20 ± 1 °C. Dále byl stanoven obsah sušiny rostlin, sušený v sušárně při 105 °C do konstantní hmotnosti, pro varianty mechanické stimulace a jednotlivé koncentrace růstových regulátorů.

Obsah vody: Ze standardně napěstovaného rostlinného materiálu byly vyhodnoceny a) kontrolní rostliny, bez známek poškození a b) rostliny, u kterých se projevila hyperhydratace – vodnatost, deformace listů, průsvitnost pletiv, tloušťnutí stonku a listů. Z každého souboru rostlin byly odebrány vzorky pro stanovení obsahu vody v pletivech rostlin. Pro stanovení čerstvé hmotnosti byly váženy jednotlivé soubory rostlin samostatně. Následně byly rostliny nařezány na segmenty 2 cm dlouhé a nechaly se dosytit po dobu dvou hodin při teplotě 20 °C. Poté byly vzorky umístěny do sušárny a při teplotě 105 °C byly sušeny do konstantní hmotnosti. Výpočet pro stanovení obsahu vody byl vypočten podle vzorce: $V = (\text{čerstvá hmotnost} - \text{sušina}) * 100 / (\text{čerstvá hmotnost})$ (Šesták a Čatský, 1966).

Obsah chlorofylů: Pro stanovení obsahu chlorofylů byly použity listy tří genotypů (Djambul2, Unikát, Dukát), které byly pěstovány v *in vitro* podmínkách. Obsah chlorofylů byl stanoven z listů kontrolních rostlin, které nevykazovaly známky poškození, byly bez

jakýchkoliv změn, bez hyperhydratovaných pletiv a deformací rostlinných orgánů. Porovnání obsahu chlorofylů bylo provedeno na listech rostlin, které byly hyperhydratované, poškozené, zkroucené, světlé, vodnaté.

Po odběru 2 g rostlin z každé skupiny – hyperhydratovaných a normálně vyvinutých, se extrahovaly pigmenty v nepolárním rozpouštědle – acetonu, pro narušení thylakoidních membrán se přidal křemenný písek, pro neutralizaci organických kyselin byl použit $MgCO_3$. Rostlinný materiál byl rozetřen ve třecí misce na homogenní kaši, postupně byl přiléván aceton až do doby, kdy pigmenty rostlin přešly do acetonu, extrakt s pigmenty byl filtrován, celkový objem acetonového extraktu činil 50 ml.

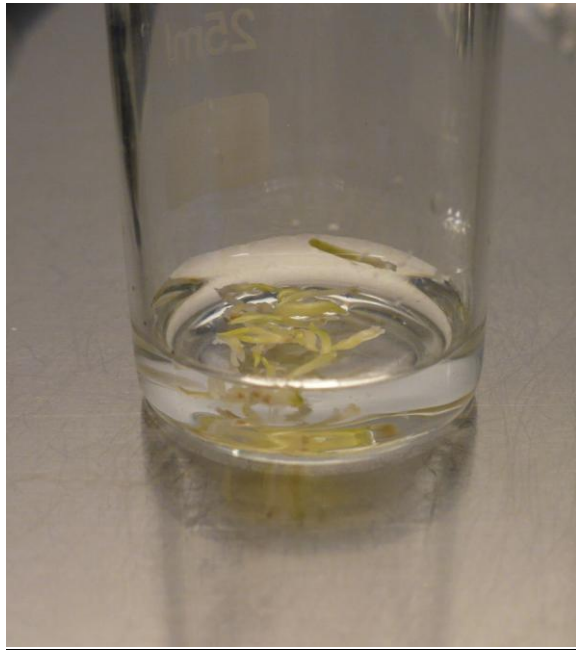
Tento extrakt byl dále použit ke spektrofotometrickému stanovení obsahu chlorofylů a a b, který byl měřen na spektrálním kolorimetru SPEKOL 11 (Carl Zeiss Jena, Německo) při vlnových délkách 663 nm, 647 nm a 470 nm. Z naměřených hodnot absorbance byly vypočteny obsahy chlorofylů, dle matematických vztahů Arnona (1949).

4.2.3 Optimalizace složení a koncentrace kryoprotektivních látek

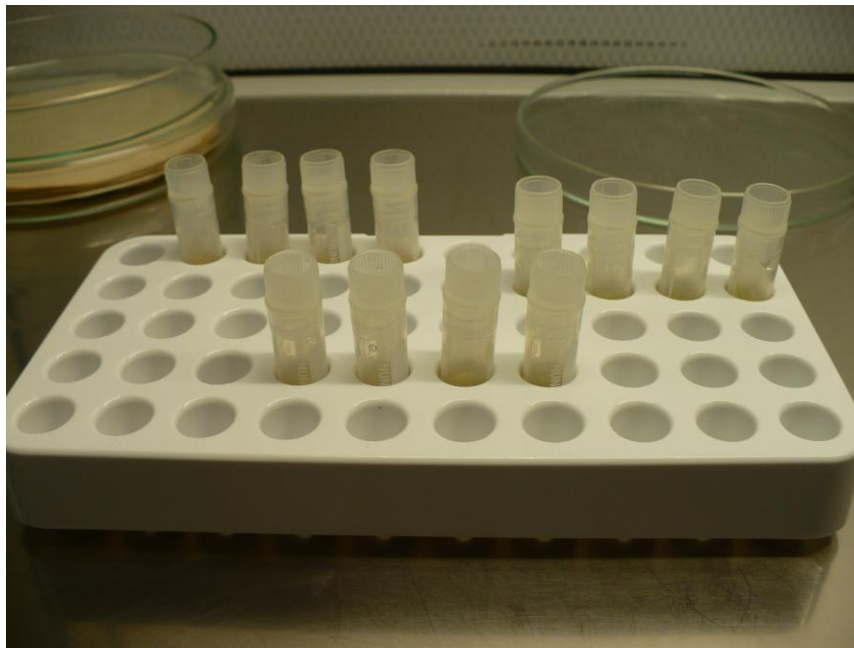
Kryoprezervace: Kryoprotokol byl vyvinut na základě PR (z angl. Public Relations), tedy na základě dlouhodobého výzkumu, mnoha zkušenostech, sběru dat a výměny informací.

Předkultivace: Pacibulky byly povrchově sterilizovány 2% roztokem isothiazolinone (5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one), poté z nich byly ve sterilním laminárním boxu vyjmuty vzrostné vrcholy, které byly přeneseny na kultivační MS médium s obsahem 10% sacharózy a byly umístěny do kultivačního boxu při teplotě 20 ± 1 °C.

Kryoprezervace: Po 24 hodinách byly vzrostné vrcholy přemístěny do kádinky a bylo přidáno 10 ml LS (Loading Solution, 13,7 % sacharózy a 18,4 % glycerolu). Po 20 minutách byl LS odstraněn a bylo přidáno 10 ml PVS roztoku (v koncentracích 30/30; 35/35; 40/40; 45/45; 50/50 w/v % sacharóza/glycerol (Obr. 13), pro srovnávací kryoprezervaci byla použita koncentrace 50/50 w/v % sacharóza/glycerol). Po uplynulém čase (30; 60; 90; 120; 150; 210 minut) byl roztok PVS odstraněn a vzrostné vrcholy byly přemístěny na sterilní hliníkové plíšky. Plíšky se vzrostnými vrcholy byly ponořeny do tekutého dusíku do vychlazených a označených kryozkumavek (Obr. 14), kde byly ponechány nejméně 60 minut. Každá kryozkumavka obsahovala 2 hliníkové plíšky s 10 vzrostnými vrcholy, tj. celkem bylo 20 vzrostných vrcholů v jedné kryozkumavce.



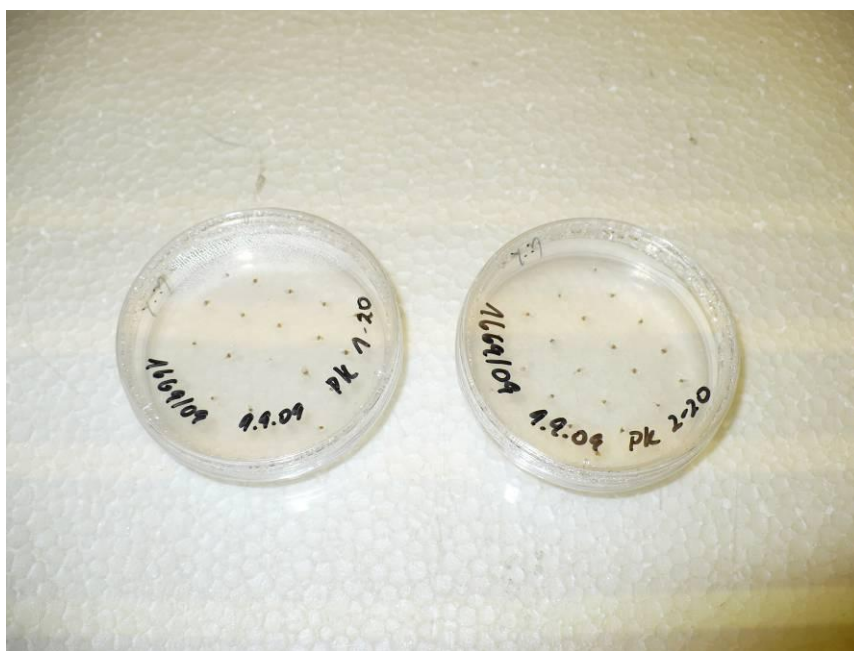
Obrázek 13. Vzrostné vrcholy genotypu Djambul2 ponořené v kryoprotektivním PVS3 roztoku (foto autor).



Obrázek 14. Vzrostné vrcholy genotypu Djambul2 umístěné na hliníkových plíškách a uzavřené v kryozkumavkách před ponořením do tekutého dusíku (foto autor).



Obrázek 15. Vzrostné vrcholy genotypu Djambul2 odtávané po kryoprezervaci, vyjmuté z tekutého dusíku, ponořené do teplé vodní lázně (foto autor).



Obrázek 16. Vzrostné vrcholy genotypu Djambul2 vysazené na regenerační médium po kryoprezervaci (foto autor).

Regenerace po kryoprezervaci: Při odtávání byly zamrazené vzorky rychle vyndány z LN a ponořeny do teplé vodní lázně (40 ± 1 °C), kde roztávaly 1-2 min (Obr. 15). Z vrcholů byl osmoticky odstraněn vitrifikační roztok PVS (30/30; 35/35; 40/40; 45/45; 50/50 w/v %

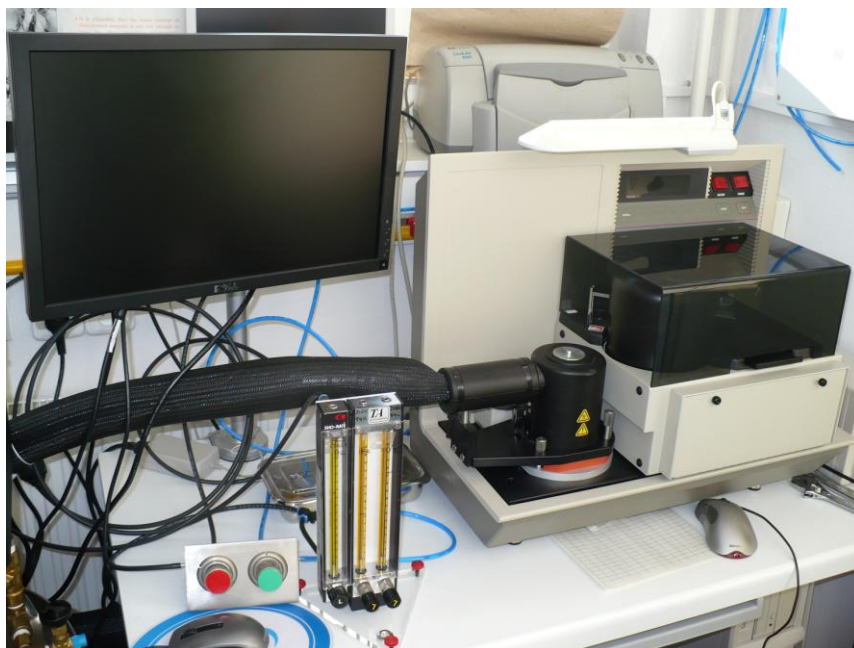
sacharóza/glycerol). Po 1-2 min byly apexy přeneseny na kultivační MS médium s obsahem 10% sacharózy (Obr. 16). Vzorky byly umístěny do kultivačního boxu s teplotou 20 ± 1 °C a byly ponechány 7 dní ve tmě. Poté byly přemístěny na světlo $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (16 hod světlo a 8 hod tma).

Hodnocení přežití a regenerace rostlin bylo provedeno vizuálně sčítací metodou, a to po 2 a 10 týdnech od kryoprezervace. Při prvním hodnocení – přežití – se počítala každá rostlina, u které byl patrný růst a byla zelená (nedocházelo ke ztrátě chlorofylu); při druhém hodnocení – regeneraci – se počítaly pouze ty rostliny, které měly vyvinuté listy a rostly. Úspěšnost kryoprezervace byla hodnocena pomocí regenerace rostlin v *in vitro* podmínkách.

Termická analýza: Kalorimetrická měření byla provedena měřením pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru – TA 2920 (TA Instruments, USA) (Obr. 17) a Q 2000 (Obr. 18). Teplotní stupnice byla kalibrována destilovanou vodou, cyklohexanonem, rtutí a bodem tání india. Entalpie tání india byla použita při kalibraci stupnice tepelného toku. Tepelná kapacita byla kalibrována pomocí terčíku čistého safíru.

Termická analýza roztoku PVS3 a jeho modifikací o různých koncentracích a dehydrovaných vzrostných vrcholů v těchto roztocích byla provedena na DSC. Vzrostné vrcholy ($10 \pm 0,5$ mg rostlinného materiálu, tj. 4–5 ks) byly umístěny do hermeticky uzavíratelných pánviček, zalisovány a umístěny do měřicí DSC komory. Rychlost chlazení byla nastavena na 10 °C min^{-1} z 20 do -55 °C , následným krokem programu DSC bylo izotermní chlazení při -55 °C po dobu 5 min pro ustálení teploty ve vzorku. Potom byl vzorek ohříván do 40 °C stejnou rychlostí jako při chlazení. Pro stanovení skelného přechodu (T_g) a objemu krystalické vody v rostlinných pletivech byl použit vyhodnocovací software pro DSC, Universal Analysis 2000 verze 4.7A (TA Instruments, USA). Dále byl. Pomocí DSC byl stanoven obsah krystalické vody ve vzorku, teplota tání a jejich entalpie.

Obsah vody jednotlivých vzorků byl stanoven gravimetricky a vyjádřen v gramech vody na gram sušiny (gv/gs), které byly vysušeny do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C . Procentický obsah vody (%) byl stanoven rozdílem čerstvé hmoty a sušiny v poměru ku čerstvé hmotě a vynásoben stem.



Obrázek 17. Diferenční skenovací kalorimetr – TA 2920, TA Instruments, pro měření termické analýzy (foto autor).



Obrázek 18. Nový typ diferenčního skenovacího kalorimetru – Q 2000, TA Instruments, pro měření termické analýzy (foto autor).

4.3 Hodnocení naměřených hodnot

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu, korelační analýzy na hladině významnosti $P \geq 0,05$. Ke statistickému zpracování výsledků byl použit počítačový program Statistica 7.0.

Jednotlivé výpočty, následné zpracování výsledků a grafické vyhodnocení měřených rostlin bylo provedeno pomocí tabulkového programu Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation).

Hodnocení naměřených dat bylo provedeno metodou vizualizace pomocí analýzy obrazu, pro sledování změn byly použity mikroskopické metody (Lang-Pauluzzi, 2000). Ke zpracování obrazového materiálu byly použity počítačové programy pro práci s obrázky, animacemi, videi, např. Ulead Photo Explorer 8.0, ImageJ 1.38x.

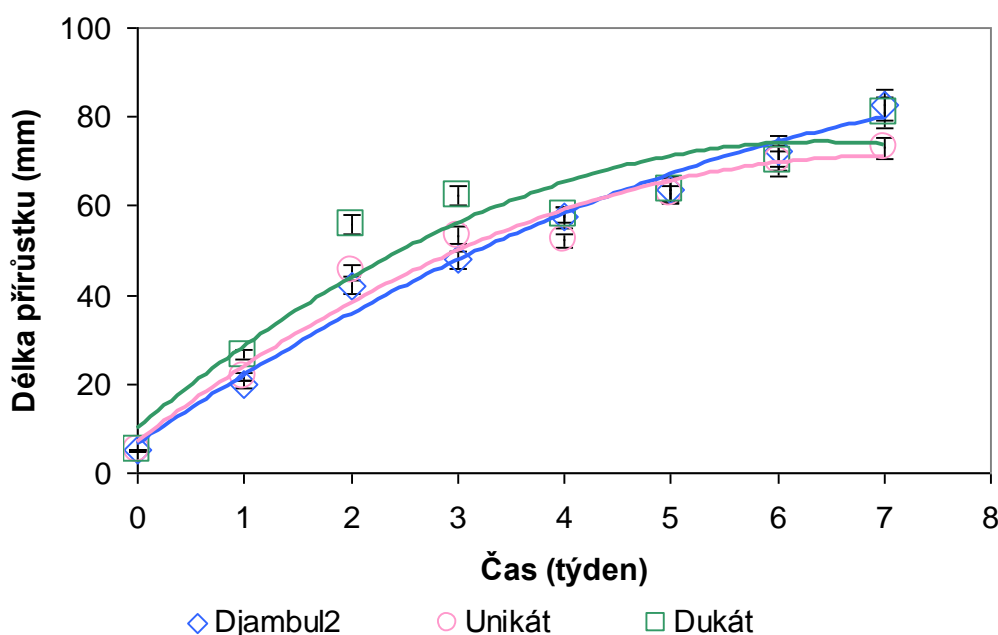
5 Výsledky a diskuze

Práce je členěna na dílčí části odpovídající předeslaným cílům a hypotézám, první z nich se zabývá charakteristikou růstu explantátových kultur česneku v *in vitro* podmínkách. V počáteční fázi byl sledován dlouhivý růst jako nejcitlivější fyziologická odezva na stres, který se vyskytoval při kultivaci rostlin v *in vitro* podmínkách. Dalším okruhem byla charakteristika růstu, která odrážela syntézu látek přijatých z živné půdy a syntézu látek jako výsledek fotosyntetické aktivity. Růstová analýza byla nástrojem pro sledování a charakteristiku růstu rostlin česneku v *in vitro* podmínkách. Tato analýza byla vytvořena pro sledování rostlin v polních podmínkách (Hunt a Nicholls, 1986; Richards, 1959), později byla použita také pro *in vitro* rostliny. V této práci je poprvé použita pro rostliny česneku pěstované v *in vitro* podmínkách.

5.1 Charakteristika růstu česneku v *in vitro* podmínkách

Výrazný dlouhivý růst rostlin byl zaznamenán v období mezi prvním a třetím týdnem (Obr. 19) kultivace. V tomto období se tvořila listová nadzemní část. Největší nárůst byl zaznamenán zpočátku u genotypu Dukát a to do délky rostlin 26 ± 5 mm, naopak nejnižší potom byla u genotypu Djambul2 19 ± 6 mm. Ve třetím týdnu došlo k růstu prvních kořenů v bazální části explantátů, dosažení maximální délky prvních listů a postupnému zasychání špiček prvních listů. V dalších týdnech došlo k nárůstu kořenové části rostlin a tvorbě nových listů, tedy k nárůstu celkové délky rostlin na 82 ± 8 mm u genotypu Djambul2. V následujících týdnech již prodloužení délky rostlin nebylo tak výrazná jako v prvních týdnech kultivace. Mezi prvním a druhým týdnem dlouhivého růstu byl zaznamenán přírůstek o 397 % (20 mm/týden). Délka rostlin dosáhla mezi prvním a druhým týdnem 24 % z celkové konečné délky. V intervalu mezi druhým a třetím týdnem byla rychlost růstu 21 mm/týden, v následujícím týdnu následovalo zpomalení růstu na 14,5 mm/týden. V průběhu posledního sledovaného týdne byla největší délka u rostlin genotypu Djambul2, nejvyšší rychlost dlouhivého růstu u tohoto genotypu byla stanovena 12 mm/týden. Nejvýraznější počáteční růst byl zaznamenán u genotypu Dukát (26 mm/týden), tj. nárůst délky rostlin byl 5krát vyšší oproti původní délce, z celkové délky rostlin tento nárůst činil 33 %. Mezi druhým a třetím týdnem bylo dosaženo u tohoto genotypu nejvyšší rychlosti růstu, a to až 28 mm/týden.

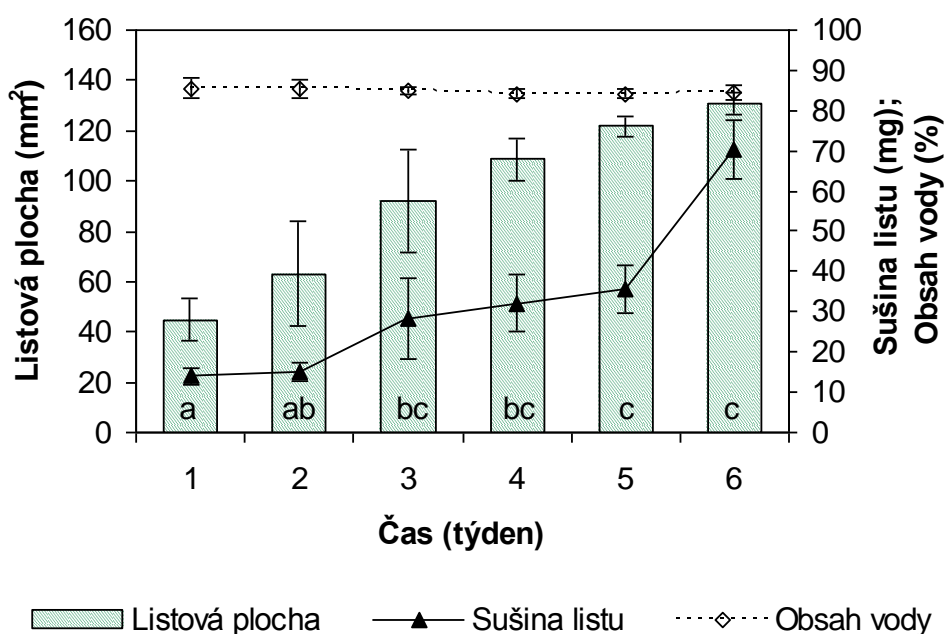
V následujícím období došlo ke zpomalení rychlosti dlouživého růstu na 17 mm/týden, v šestém týdnu 13 mm/týden, v závěru byla rychlost dlouživého růstu u genotypu Dukát 12 mm/týden. Nejpomaleji přirůstal genotyp Unikát (výsledná délka 73 ± 6 mm), nárůst oproti prvnímu týdnu byl 4krát vyšší, z celkové délky tento podíl činil 30 %. Zpočátku byla rychlost růstu neprůkazně vyšší (22 mm/týden) než u genotypu Djambul2 (20 mm/týden), v následujícím týdnu došlo k nárůstu rychlosti růstu (23 mm/týden), v intervalu mezi třetím a šestým týdnem nastalo zpomalení rychlosti dlouživého růstu (18–13 mm/týden). V posledním týdnu byla rychlost dlouživého růstu genotypu Unikát nejnižší (11 mm/týden), stejně tak jako u genotypu Dukát. Zobrazená spojnice trendu (Obr. 19) udává nárůst rychlosti dlouživého růstu rostlin v průběhu sedmi sledovaných týdnů vegetačního období v *in vitro* podmínkách. Zpočátku se projevil významný nárůst rychlosti růstu rostlin, od čtvrtého týdne strmost křivky ukazuje na zpomalení růstu třech zkoumaných genotypů.



Obrázek 19. Dlouživý růst tří různých genotypů *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách. Tmavě zelený kosočtverec – Djambul2; středně zelený čtverec – Unikát; světle zelený trojúhelník – Dukát; chybové úsečky – směrodatné odchylky střední hodnoty průměru vypočítané ze třech opakování; hodnota korelačního koeficientu pro Djambul2: 0,986, Unikát: 0,966, Dukát: 0,910; korelační křivka a hodnota statistické významnosti ukazují nárůst délek rostlin, všechny korelační koeficienty byly významné na hladině významnosti $P = 0,05$.

Nárůst velikosti listové plochy genotypu Djambul2 je zobrazen na Obr. 20. Největší nárůst listové plochy byl v období mezi prvním (44 ± 8 mm², 65 % z celkové velikosti listové plochy) a třetím (92 ± 20 mm², 29 % z celkové velikosti listové plochy) týdnem kultivace,

kdy došlo k nárůstu nových listů. V dalším období nastal růst kořenové části, zasychání špiček nejstarších listů, tvorbě nových listů a zesílení rostlin. Listová plocha zpočátku narůstala rychlostí 45 mm²/týden, ve druhém týdnu byla rychlost růstu listové plochy 32 mm²/týden, v následujících týdnech klesala rychlost růstu listové plochy 31–22 mm²/týden. Nárůst sušiny listové (Obr. 20) byl rozčleněn do několika fází, s tvorbou nových listů rapidně narůstá sušina a to v rozmezí druhého (15 ± 2 mg, tj. 80 % nárůst sušiny oproti prvnímu týdnu) a třetího (28 ± 2 mg) týdne a potom s tvorbou dalších listů mezi pátým (35 ± 5 mg) a šestým (70 ± 7 mg) týdnem kultivace. Obsah vody v rostlinných pletivech (84–85 %) se po celou dobu kultivace významně neměnil.



Obrázek 20. Listová plocha a hmotnost sušiny listů rostlin genotypu Djambul2 kultivovaného v *in vitro* podmínkách v průběhu šesti týdnů. Šrafovaný sloupec – listová plocha; plný trojúhelník – sušina listů; prázdný kosočtverec – obsah vody v rostlinném pletivu; chybová úsečka reprezentuje směrodatnou odchylku vypočítanou ze tří opakování, v každém opakování bylo 10 rostlin; sloupce s odlišnými písmeny a,b,c se statisticky významně liší na hladině významnosti $P = 0,05$.

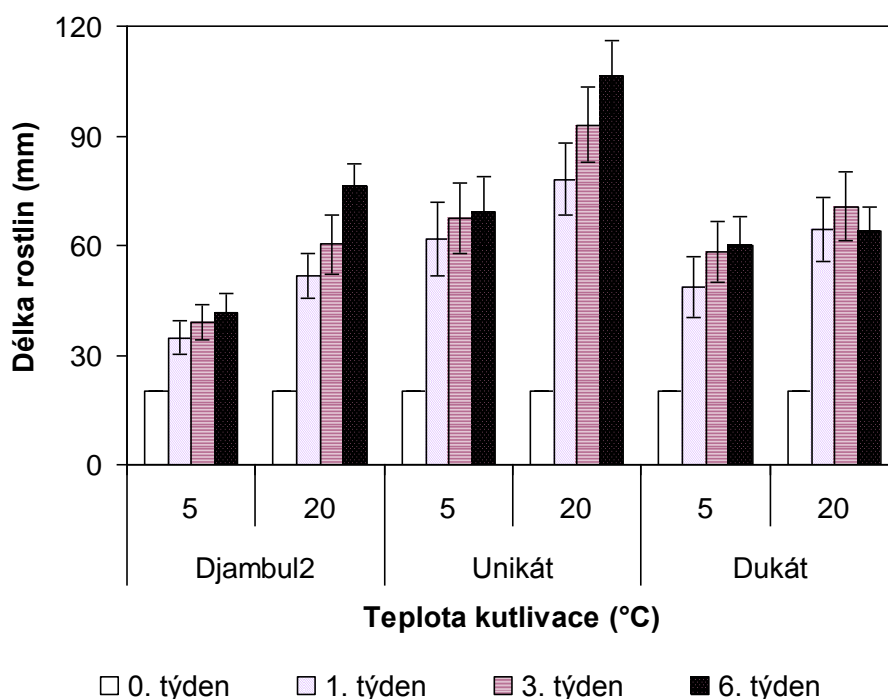
Růst rostlin je v *in vitro* podmínkách ovlivněn abiotickým stresem, kterému je rostlina vystavena, tj. teplota při kultivaci, úroveň radiace, složení a pH kultivačního média. Je obecně známo, že stres vyvolá stresovou reakci, která aktivuje obranné mechanismy. U rostlin patří mezi takové obranné mechanismy především schopnost regenerace. Schopnost adaptace umožňuje rostlinám zvýšit jejich odolnost vůči stresoru postupným otužováním. Kubota (Kubota a Kozai, 1992) pěstovali *Solanum tuberosum* L. v *in vitro* podmínkách, sledovali

rychlost růstu rostlin na MS médiu. Uvádí, že první dva týdny po přesazení rostlin na čerstvé kultivační MS médium byla hodnota velikosti listové plochy rostlin nízká, rostliny se adaptovaly na změnu, a poté začala listová plocha zvyšovat (až 3,3krát v pátém týdnu), kdy rostliny regenerovaly. Z výsledků této práce byl statisticky průkazný vliv genotypu na rychlost dlouhivého růstu. Genotyp Djambul2 vykazoval největší změny rychlosti dlouhivého růstu v prvních týdnech kultivace (po vysazení na čerstvé kultivační médium), v závěru experimentu dosahoval zároveň nejvyšších hodnot (rychlost dlouhivého růstu 12 mm/týden) oproti dalším dvěma genotypům. Genotyp Unikát měl nejnižší rychlost dlouhivého růstu v rozmezí 23–12 mm/týden. Výsledky ukazují, že genotyp Dukát dosahoval maximálního dlouhivého růstu (28 mm/týden) v období mezi druhým a třetím týdnem kultivace v *in vitro* podmínkách. Vývoj listové plochy zpočátku sledovaného období vykazoval významný nárůst, růst velikosti listové plochy se od počátku postupně zpomaloval. Dosažené výsledky ukazují na postupné vyčerpávání živin z kultivačního média. Na základě těchto výsledků lze doporučit pasážování rostlin na čerstvé kultivační médium nejpозději po šesti týdnech.

5.1.1 Vliv teploty na rychlost růstu

Srovnání rychlosti růstu česneku v *in vitro* podmínkách v závislosti na kultivační teplotě uvádí Obr. 21. Teplota kultivace rostlin *Allium sativum* může ovlivnit přežití a regeneraci rostlin po kryoprezervaci, proto bylo nutné zjistit, při jaké teplotě mají rostliny vyšší schopnost regenerace. K největšímu nárůstu délky rostlin, tedy nejrychleji rostly rostliny v prvním týdnu kultivace a to ve všech teplotních variantách. Při teplotě 20 °C rostliny všech tří genotypů rostly statisticky významně rychleji (v průměru o 20 mm/týden) než při teplotě 5 °C. Při teplotě 5 °C došlo k významnému nárůstu rostlin mezi prvním a druhým týdnem zejména u genotypu Unikát (78 mm/týden) a poté přirůstaly již pomaleji (31–17 mm/týden). Při teplotě 20 °C byly patrné dva větší nárůsty do délky u genotypu Djambul2. V prvním týdnu došlo k růstu délky listové plochy na 52 ± 4 mm, třetí týden se vyvíjela kořenová část rostlin a špičky starších listů postupně zasychaly, délka dosahovala 61 ± 8 mm, v šestém týdnu kultivace při teplotě 20 °C byl zaznamenán druhý výrazný nárůst listové plochy a celkový růst rostlin dosáhl hodnot 76 ± 6 mm. Tento proces se opakoval i u ostatních genotypů, avšak genotypy Unikát a Dukát vytvářely listovou plochu signifikantně rychleji než Djambul2. Nejvyšší rychlost růstu se projevila u genotypu Unikát, kde byla po šesti týdnech naměřena délka rostlin 106 ± 9 mm, avšak rychlost růstu byla 17 mm/týden. V šestém týdnu

kultivace při teplotě 20 °C bylo patrné u genotypu Dukát výrazné zasychání špiček listů a došlo i k poklesu celkové délky rostlin z 71 ± 8 na 64 ± 6 mm, rychlost růstu klesla z 23 na 10 mm/týden. Existuje práce, ve které se autor zabývá předkultivací rostlin *Allium sativum*, resp. hledá vhodnou teplotu pro kultivaci rostlin před kryoprezervací (Keller, 2005). V jeho práci byly použity teploty: nepřetržitě 25 °C, kolísání teploty 25 °C přes den a -1 °C v noci (16/8 h den/noc), a nepřetržitě 2 °C po dobu 10–12 týdnů. Nejvyšší přežití (70–85 %) a regenerace (40–60 %) se prokázala u varianty s kolísavou teplotou. Xu *et al.* (2008) porovnává vliv teploty (15; 20; 25; 30 °C) na rychlost růstu rostlin *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách, přičemž nejrychleji rostliny rostly při 30 °C.

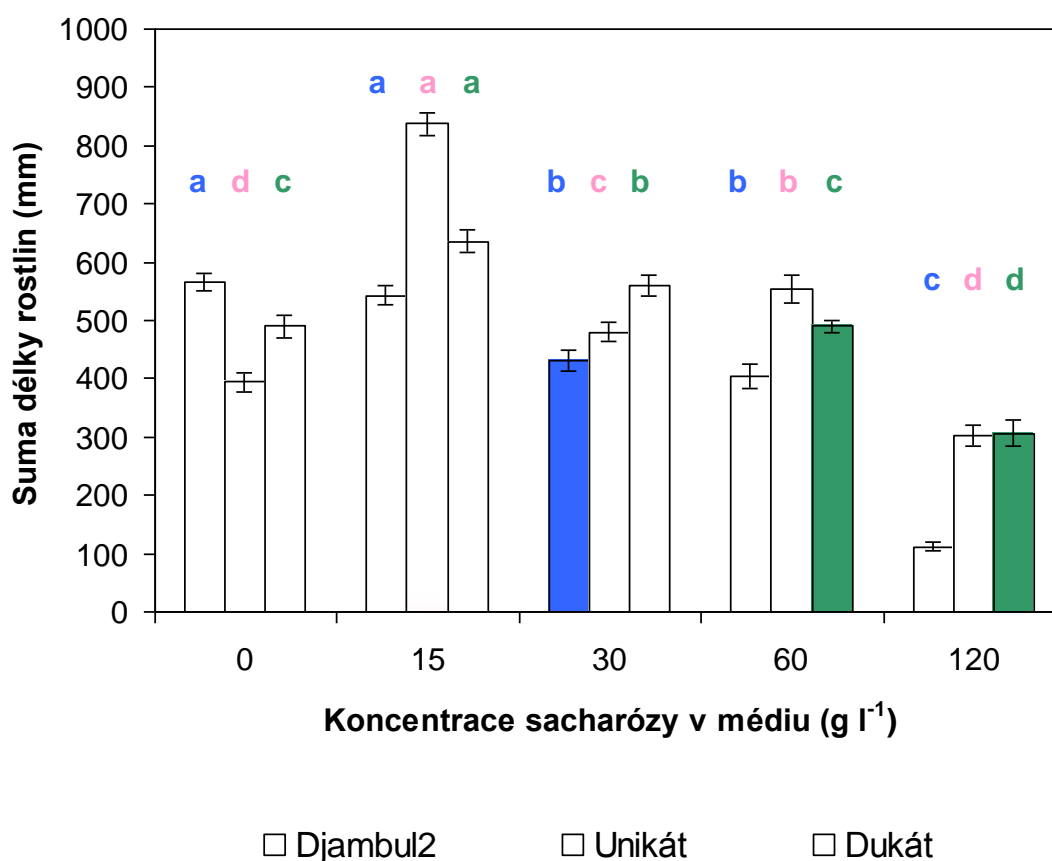


Obrázek 21. Vývoj růstu tří genotypů rostlin *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách ovlivněný nízkou ($+5 \pm 1$ °C) a vysokou ($+20 \pm 1$ °C) teplotou kultivace. Prázdný sloupec – počáteční délka rostlin; šikmé pruhy – délka rostlin po 1 týdnu kultivace; vodorovné pruhy – délka rostlin po 3 týdnech kultivace; plný sloupec – délka rostlin po 6 týdnech kultivace; chybová úsečka – směrodatná odchylka vypočtená z 20 rostlin každého genotypu, měření byla třikrát opakovaná.

5.1.2 Vliv sacharózy v médiu na růst rostlin

Zdrojem energie pro růst rostlin je sacharóza pro vysoký obsah uhlíku. Kultivační médium s různou koncentrací sacharózy (0; 15; 30; 60; 120 g l⁻¹) ovlivnilo po šesti týdnech růst rostlin česneku (Obr. 22). Rostliny kultivované na médiu bez sacharózy rostly výrazně lépe než rostliny pěstované při maximální koncentraci 120 g l⁻¹ sacharózy v médiu. Na médiu

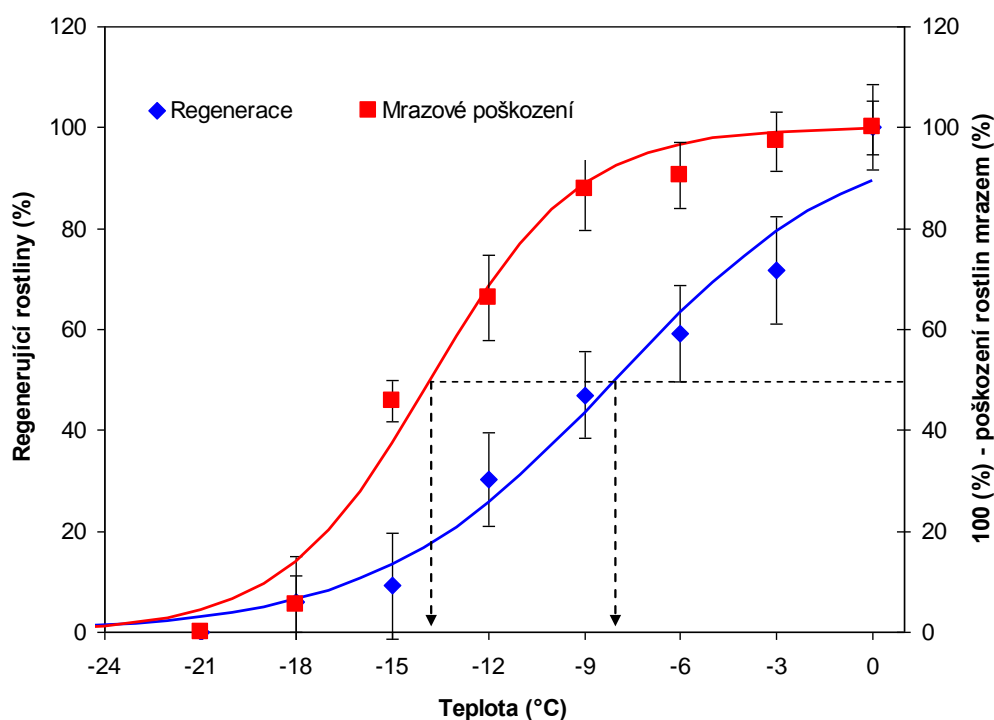
bez sacharózy, rostly nejlépe rostliny genotypu Djambul2, hodnota délky rostlin dosahovala $63 \pm 1,6$ mm, při koncentraci 15 a 60 g sacharózy v médiu nejvíce rostly rostliny genotypu Unikát (při 15 g l⁻¹ byla délka $93 \pm 2,2$ mm, 60 g l⁻¹ byla délka $61 \pm 2,6$ mm), při koncentraci 30 g sacharózy v médiu nejlépe rostly rostliny genotypu Dukát (30 g l⁻¹ byla délka $62 \pm 1,2$ mm). Nejpomalejší růst byl prokázán při koncentraci 120 g sacharózy v médiu a to u všech tří genotypů rostlin, naopak ve všech případech se prokázala nejvhodnější koncentrace 15 g l⁻¹ sacharózy v kultivačním MS médiu, vlivem kterého byly naměřeny hodnoty délky rostlin Djambul2 $60 \pm 1,8$ mm, Unikát $93 \pm 2,2$ mm a Dukát $70 \pm 2,1$ mm. Ve své práci Xu *et al.* (2008) uvádí optimální koncentraci 12 g l⁻¹ sacharózy pro růst česneku, která je srovnatelná s našimi výsledky.



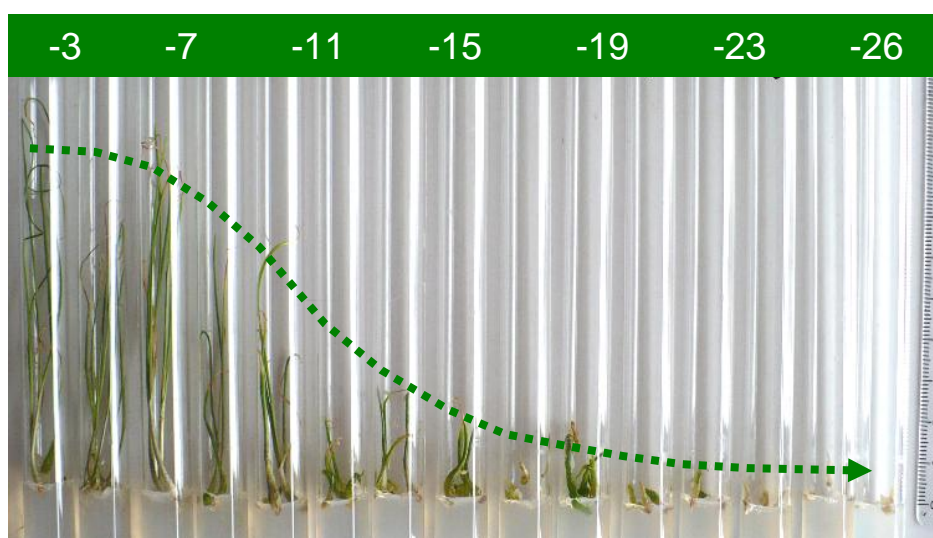
Obrázek 22. Vliv koncentrace sacharózy v kultivačním MS médiu na růst rostlin *Allium sativum* Prázdný sloupec – Djambul2; šikmé pruhy – Unikát; vodorovné pruhy – Dukát; chybová úsečka – směrodatná odchylka střední hodnoty průměru vypočítaná ze tří opakování; malá písmena představují statistické hodnocení průkaznosti rozdílů délek rostlin pro daný genotyp; shodná písmena u jednotlivých genotypů se statisticky významně neliší na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.

5.1.3 Odolnost rostlin *Allium sativum* vůči mrazu

Mrazové poškození rostlin česneku nízkými teplotami a jejich schopnost regenerace je patrná na Obr. 23. Míra poškození rostlin mrazem byla stanovena pomocí měření elektrické vodivosti vodného roztoku se vzrostnými vrcholy česneku, tj. výtokem elektrolytů z mrazem poškozených buněk vzrostných vrcholů česneku. Poškození rostlin mrazem se snižující se teplotou postupně stoupá, hodnota letální teploty LT_{50} je při teplotě $-14,3\text{ °C}$ u genotypu Djambul2. Na rozdíl od poškození, regenerační schopnost rostlin česneku s postupným snižováním teplot klesá, hodnota LT_{50} byla stanovena na teplotu $-8,2\text{ °C}$. Warnock *et al.* (1993) uvádí u cibule letální teplotu po 7 denní chladové kultivaci ($10/5\text{ °C den/noc}$) -6 °C a po 14 denní kultivaci se LT_{50} zvýšila na $-3,1\text{ °C}$. Hodnota LT_{50} pro poškozené rostliny mrazem, stanovené pomocí regenerace rostlin byla, vypočtena $-8,0\text{ °C}$ a hodnota LT_{50} stanovená výtokem elektrolytů byla $-13,8\text{ °C}$. Výsledný rozdíl mezi těmito dvěma metodami byl $5,8\text{ °C}$. Metoda měření elektrické vodivosti vodného roztoku reagovala citlivěji na změny se snižujícími se teplotami. Byla potvrzena hypotéza, že se snižující teplotou dochází k vyššímu poškození buněčné membrány a vyššímu výtoku elektrolytů. Metoda stanovení mrazového poškození rostlin *Allium sativum* pomocí regenerace rostlin se ukázala jako méně vhodná, výsledky byly velmi rozkolísané a vyhodnocování velmi obtížné (Obr. 24). Tato metoda se ukázala z materiálového hlediska a časově velmi náročná a pracná, avšak pro exaktní stanovení mrazového poškození rostlin a potvrzení rozdílnosti LT_{50} ihned po zásahu se ukázala jako vhodná. Stanovení regenerace rostlin po 10 týdnech kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách může být ovlivněno řadou faktorů a svědčí spíše o regenerační schopnosti rostlin po jejich vystavení stresoru nízké teploty.

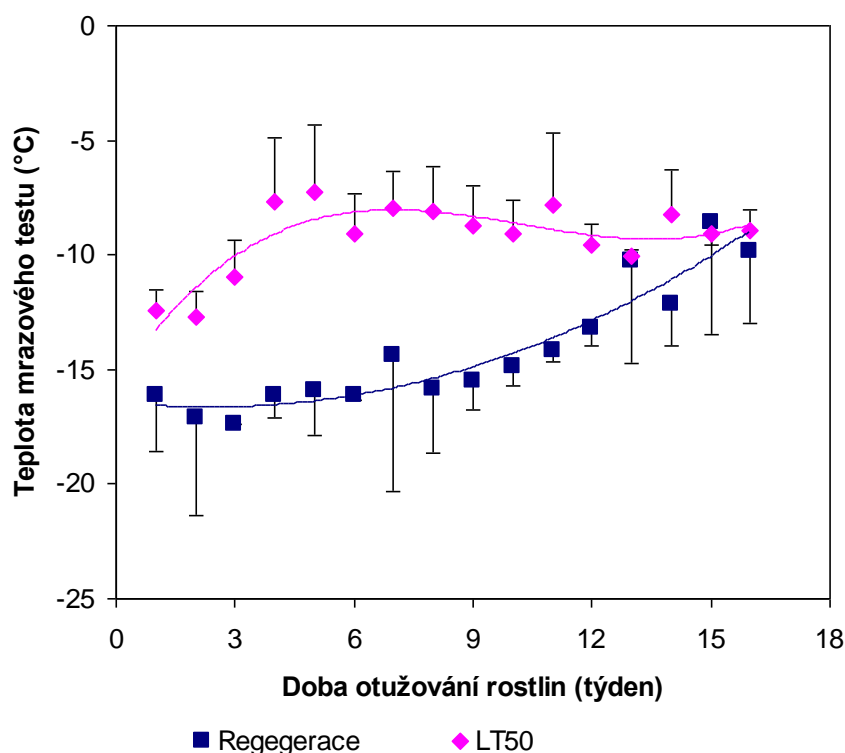


Obrázek 23. Vliv nízké teploty na úroveň mrazového poškození měřeného výtokem elektrolytu a regeneraci rostlin *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách. Regenerace rostlin po 10 týdnech kultivace na MS médiu při teplotě 20 ± 1 °C. Mrazový test byl takový, že po nukleaci média v tekutém dusíku a po mrazovém testu v ultra-kryomatu RUK 50 (MGW LAUDA, Německo) byly rostliny vysazeny na MS kultivační médium a byla sledována jejich regenerace. V druhém případě byly po mrazovém testu odebrány vzrostné vrcholy a pomocí výtoku elektrolytů byly stanoveny hodnoty úrovně mrazového poškození. Hodnotami byly proloženy korelační funkce a byl vypočítán korelační koeficient regenerace: 0,986 a korelační koeficient mrazového poškození: 0,991. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování u regenerace a ze čtyř opakování u výtoku elektrolytů.



Obrázek 24. Regenerace rostlin *Allium sativum* po mrazovém testu v *in vitro* podmínkách. Regenerace rostlin po 4 týdnech kultivace na MS médiu při teplotě 20 ± 1 °C, po nukleaci média v tekutém dusíku a po mrazovém testu v ultra-kryomatu (MGW LAUDA, RUK 50). Křivka znázorňuje snížení rychlosti růstu odpovídající regeneraci v závislosti na aplikované teplotě (foto autor).

Obrázek 25 znázorňuje náchylnost rostlin česneku k mrazovému poškození po různé době otužování (1–16 týdnů) pomocí vypočtených hodnot LT_{50} . V prvních dvou týdnech jsou rostliny vůči mrazovým teplotám nejodolnější, hodnoty LT_{50} získané pomocí elektrické konduktometrie jsou nižší (-13 až -14 °C) než hodnoty regenerujících rostlin česneku (-16 až -17 °C) odečítané po 4 týdenní kultivaci. V časovém rozmezí 4.–8. týdne mají regenerující rostliny stabilní hodnoty LT_{50} (-16 až -17 °C). U regenerujících rostlin nastává zlom od 8. týdne, kdy hodnoty LT_{50} začínají klesat. Mezi 2. a 4. týdnem dochází k poklesu hodnot LT_{50} (z -13 °C na -4 °C) u otužovaných rostlin měřených pomocí elektrické vodivosti. V dalších týdnech jsou naměřené hodnoty LT_{50} v rozmezí -4 až -9 °C a mají klesající trend.



Obrázek 25. Úroveň mrazového poškození měřena pomocí elektrické vodivosti výtoku elektrolytu rostlin *Allium sativum* znázorněná pomocí hodnot LT_{50} a regenerace rostlin v rozmezí 16 týdnů otužování rostlin při kolísavé teplotě $20/2\pm 1^{\circ}\text{C}$ a délce dne 16/8 h den/noc. Získanými hodnotami byly proloženy křivky korelační polynomické funkce a byly vypočteny hodnoty korelačních koeficientů pro regeneraci: 0,7199 a LT_{50} : 0,8917. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování u regenerace a ze čtyř opakování u konduktometrie.

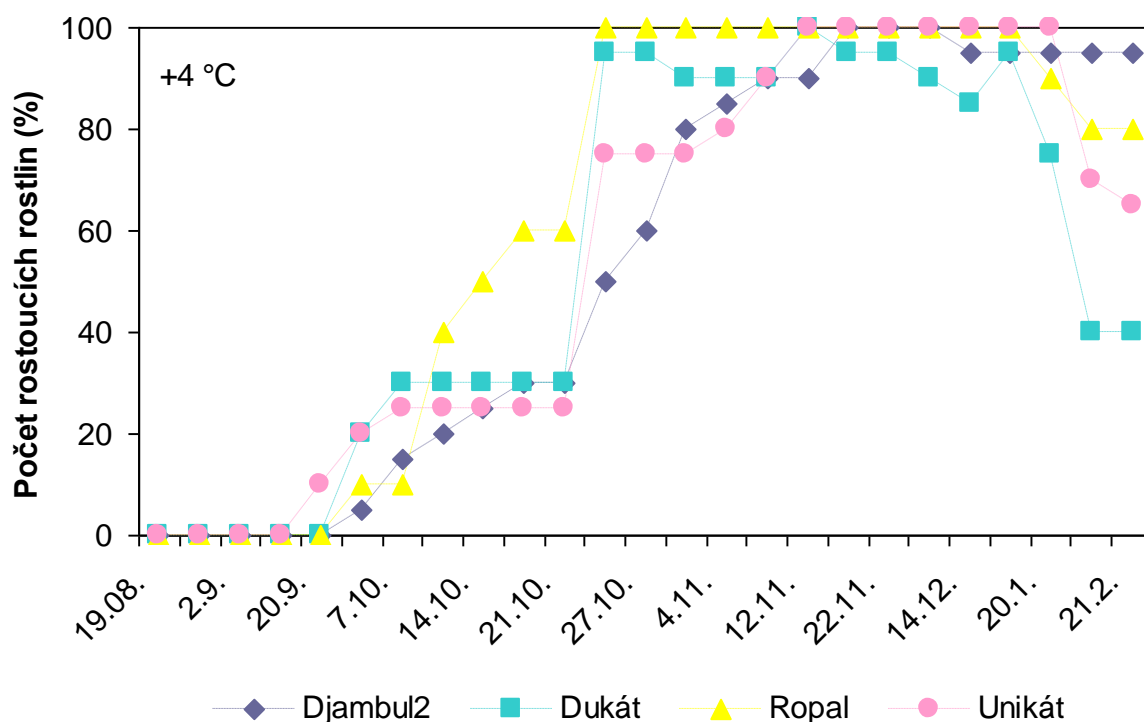
Po 13 týdenním otužování rostlin jsou již hodnoty LT_{50} u regenerujících rostlin a u rostlin měřených pomocí elektrické vodivosti téměř shodné a nacházejí se v teplotním rozmezí -8 až -10 °C. Von Fircks a Verwijst (1993) testovali *Salix viminalis* L. při teplotách -1 až -5 °C.

V obou případech získali sigmoidální křivky, které se lišily v inflexním bodu, což bylo způsobeno stanovenými podmínkami (podchlazení a nukleace) při mrazovém testu. V našich experimentech bylo podchlazení eliminováno nukleací při $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Naše výsledky odpovídají mrazovému poškození nezávisle na podchlazení.

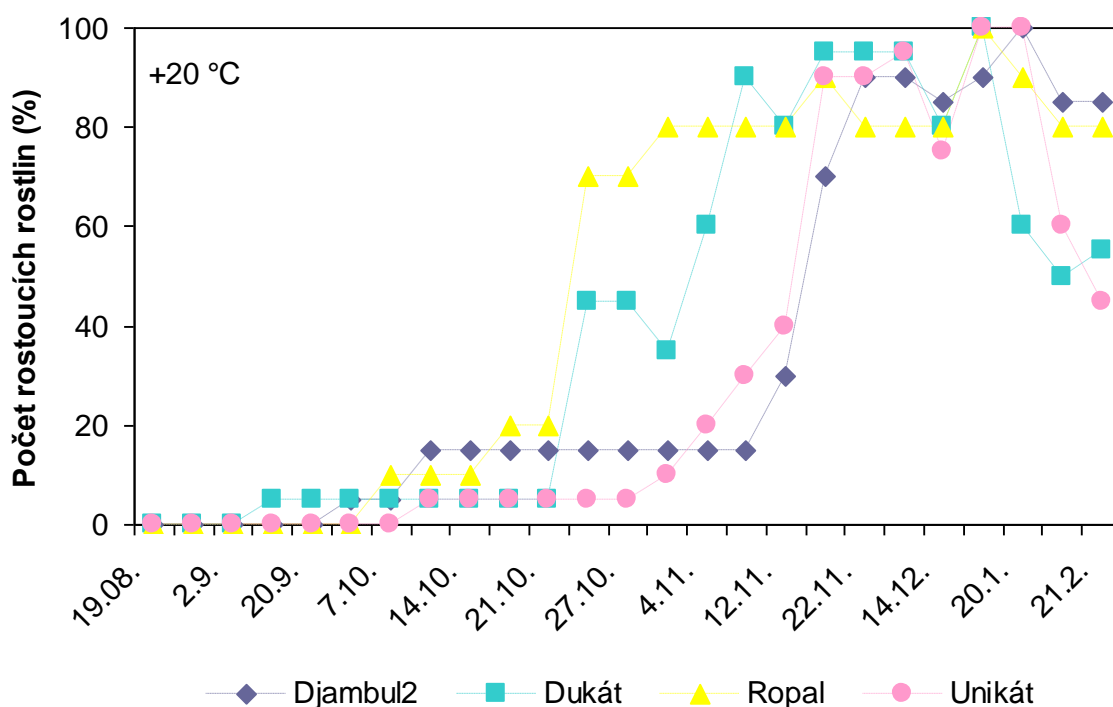
5.1.4 Délka dormance pacibulek rostlin

Dormance rostlin může způsobit zdržení při multiplikaci, a nebo může zasáhnout do regenerační schopnosti dormantních rostlin po kryoprezervaci. Experimenty byly postaveny tak, aby byl zachycen počátek výstupu rostlin z dormance. Byla testována hypotéza, zda má skladování pacibulek *Allium sativum* po sklizni při rozdílné teplotě vliv na délku dormantního stádia rostlin. Experimentální výsledky pozorující délku trvání dormance u čtyřech genotypů *Allium sativum* ukazují obr. 26, 27 a 28. Skladování při nižší teplotě ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ukazovalo na schopnost růstu pacibulek v průměru asi po 4–5 týdnech od termínu sklizně v závislosti na sledovaném genotypu *Allium sativum*, nejrychleji začínal rašit genotyp Unikát (Obr. 26). Skladovatelnost pacibulek tohoto genotypu tedy byla nižší, oproti ostatním genotypům. Při teplotě $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nastává v období mezi 5–11 týdnem po sklizni porušení dormance, kdy vzrostné vrcholy v pacibulkách začínají růst. Tato teplota udržuje pacibulky v dobré kondici po dlouhou dobu 11–23 týdnů po sklizni. Po tomto období začíná mírný pokles klíčivosti pacibulek u sledovaných genotypů. Pacibulky skladované při teplotě $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 27) měly celkově pomalejší nástup, jejich klíčivost začínala ve 3. týdnu po sklizni u genotypu Dukát, v 5. týdnu začal růst genotyp Djambul2, 6. týden byl zaznamenán růst genotypu Ropal a v 7. týdnu po sklizni začal prorůstat i genotyp Unikát. Období mezi 5–15 týdnem je přechodné, kdy pacibulky postupně zvyšují svou klíčivost a vystupují z dormance. Přibližně do 23. týdne byla u všech genotypů pozorovaná nejvyšší klíčivost, po tomto období klíčivost pacibulek opět pomalu začíná klesat. Zajímavé rozdíly mezi jednotlivými genotypy nastaly při teplotě skladování při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 28), kdy jako první začínal prorůstat genotyp Ropal a to v 6. týdnu po sklizni, 7. týden roste Djambul2, následuje poměrně dlouhá perioda a teprve v 16. týdnu se ukazuje růst tohoto genotypu, stejně jako u genotypu Unikát. V rozmezí 14–22 týdnů byla nejvyšší klíčivost zaznamenána u genotypu Ropal, ostatní tři genotypy měly své maximum mezi 18–23 týdnem. Teplota skladování pacibulek při $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ negativně ovlivnila jejich vitalitu a schopnost prorůstání, tím může být snížena úroveň regenerace po kryoprezervaci. Při teplotách nad $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ se aktivují enzymy, které štěpí disacharidy na jednoduché cukry a

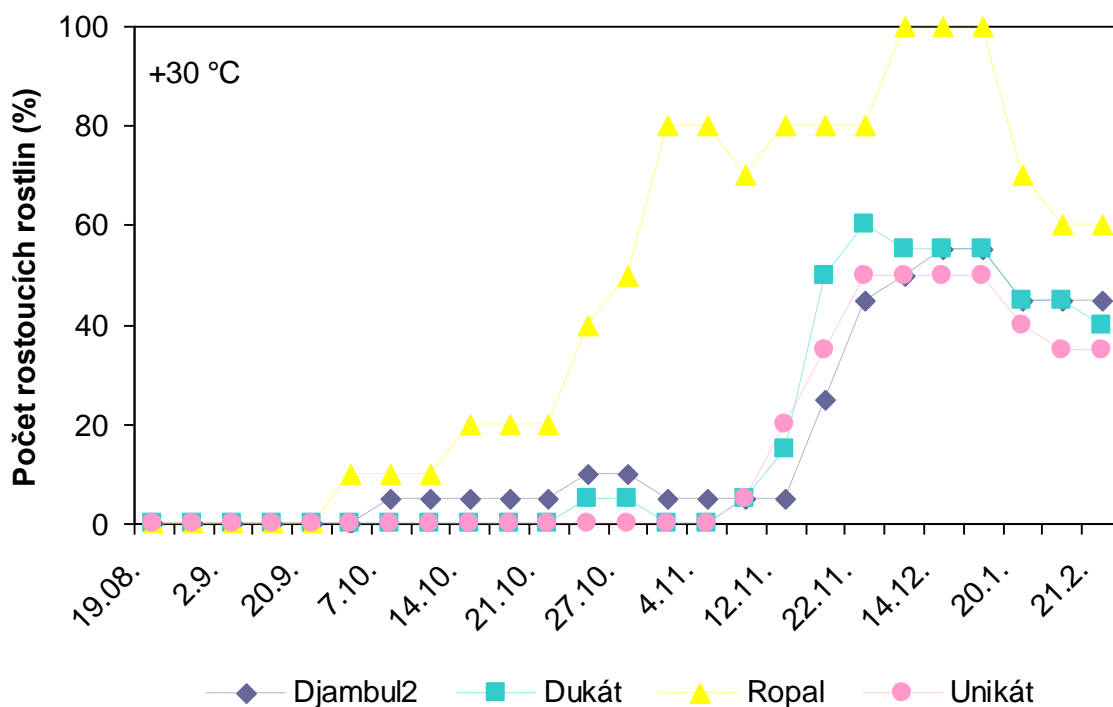
potom dochází k rašení rostlin (Pak et al. 1995). Skladováním pacibulek při teplotě pod touto hranicí by mělo být dosaženo maximální délky pro udržení jejich vitality. Kryoprezervace dormantních pacibulek dosud není známa. Pro uchování rostlin v ultra-nízkých teplotách se alternativně používají dormantní pupeny např. jabloně (Forsline *et al.*, 1998), jasan (Volk *et al.*, 2009), kaki (Matsumoto *et al.*, 2001).



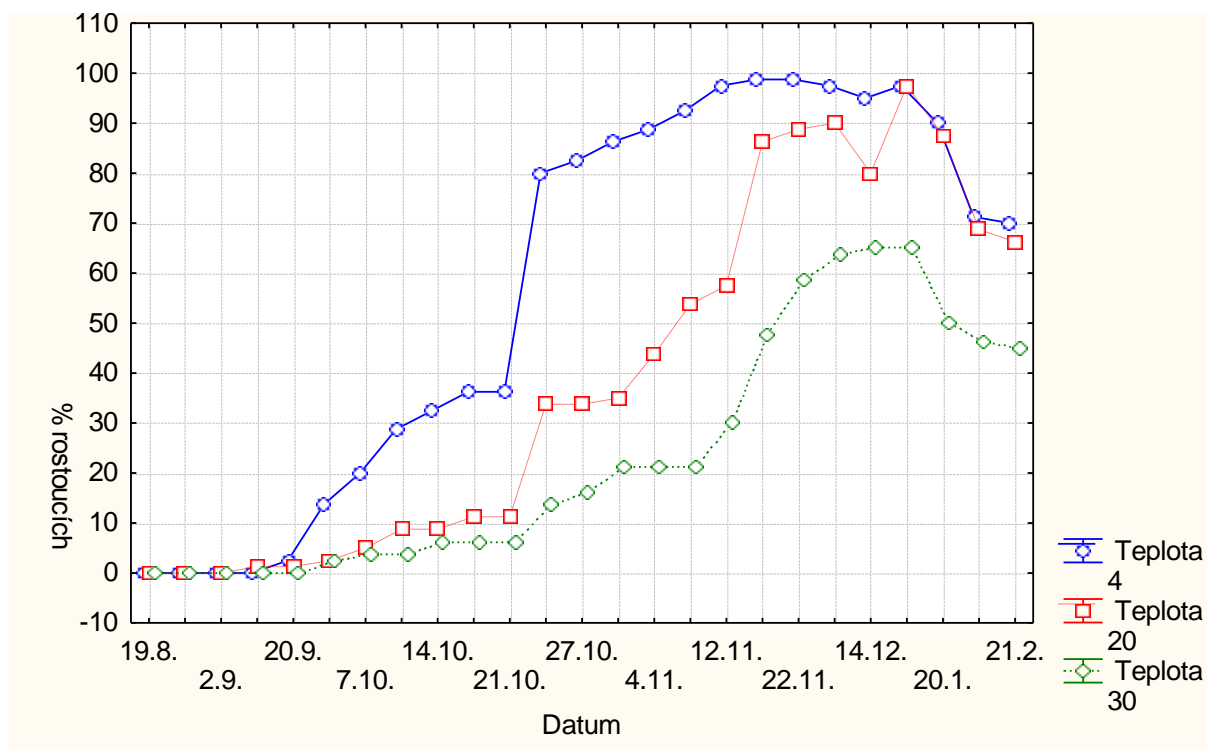
Obrázek 26. Délka trvání období dormance pacibulek genotypů *Allium sativum* (Djambul2, Dukát, Ropal, Unikát) od sklizně po snížení životaschopnosti v závislosti na teplotě (+4 °C), při které byly pacibulky skladovány. Hodnocení růstu bylo provedeno sčítací metodou rostoucích rostlin v rašelinovém substrátu po 3 týdnech od výsadby. Nejvyšší procento prorůstání bylo zjištěno u pacibulek skladovaných při +4 °C u genotypu Ropal.



Obrázek 27. Délka trvání období dormance pacibulek genotypů *Allium sativum* (Djambul2, Dukát, Ropal, Unikát) od sklizně po snížení životaschopnosti v závislosti na teplotě (+20 °C), při které byly pacibulky skladovány. Hodnocení růstu bylo provedeno sčítací metodou rostoucích rostlin v rašelinovém substrátu po 3 týdnech od výsadby. Nejvyšší procento prorůstání bylo zjištěno u pacibulek skladovaných při +20 °C u genotypu Dukát a Unikát.

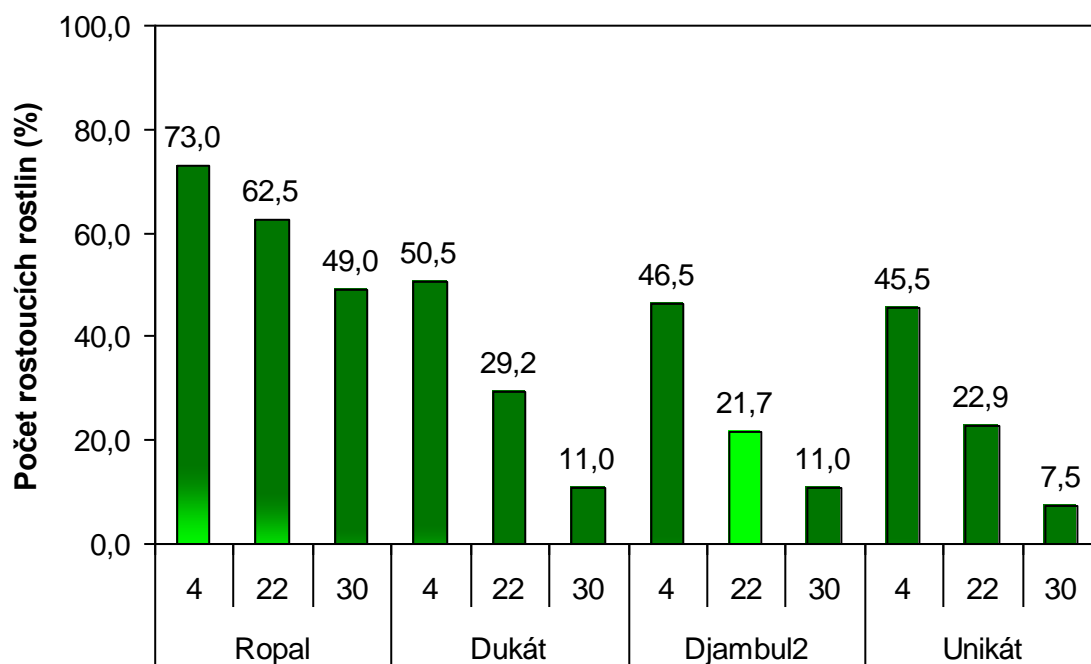


Obrázek 28. Délka trvání období dormance pacibulek genotypů *Allium sativum* (Djambul2, Dukát, Ropal, Unikát) od sklizně po snížení životaschopnosti v závislosti na teplotě (+30 °C), při které byly pacibulky skladovány. Hodnocení růstu bylo provedeno sčítací metodou rostoucích rostlin v rašelinovém substrátu po 3 týdnech od výsadby. Nejvyšší procento prorůstání bylo zjištěno u pacibulek skladovaných při +30 °C u genotypu Ropal.

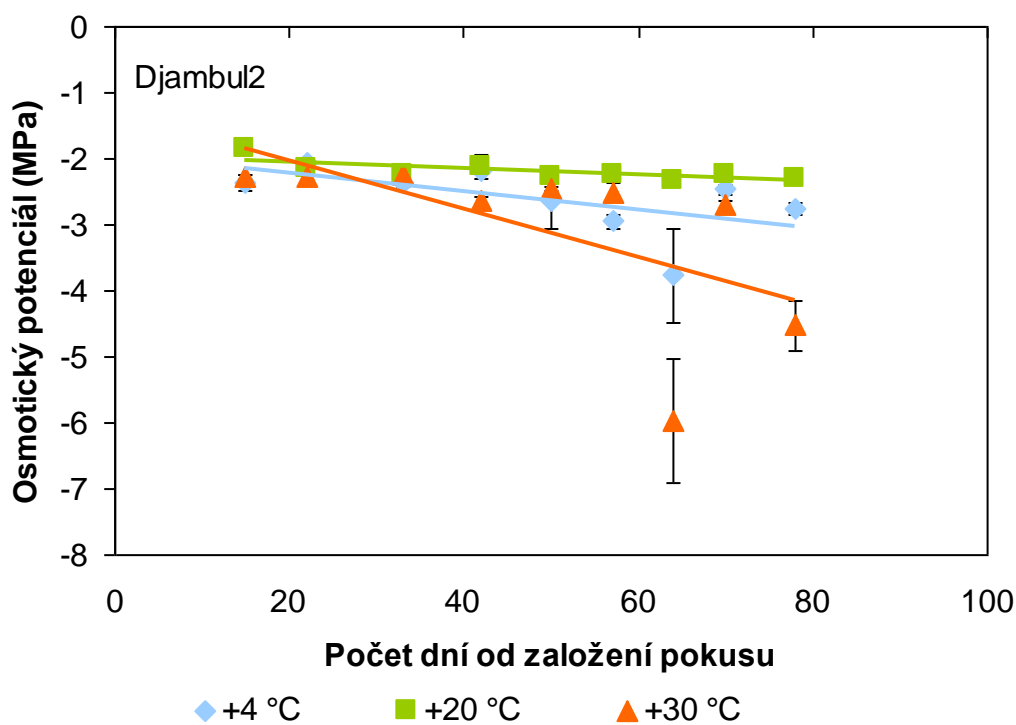


Obrázek 29. Průměrná rychlost prorůstání pacibulek *Allium sativum* u čtyř genotypů v časové závislosti, při rozdílné teplotě skladování (+4, +20, +30 °C). Hodnoty byly statisticky zhodnoceny metodou ANOVA na hladině významnosti $P = 0,05$. Průkazně nejvhodnější teplota pro skladování byla při +4 °C, významně se lišila od 6. týdne kultivace.

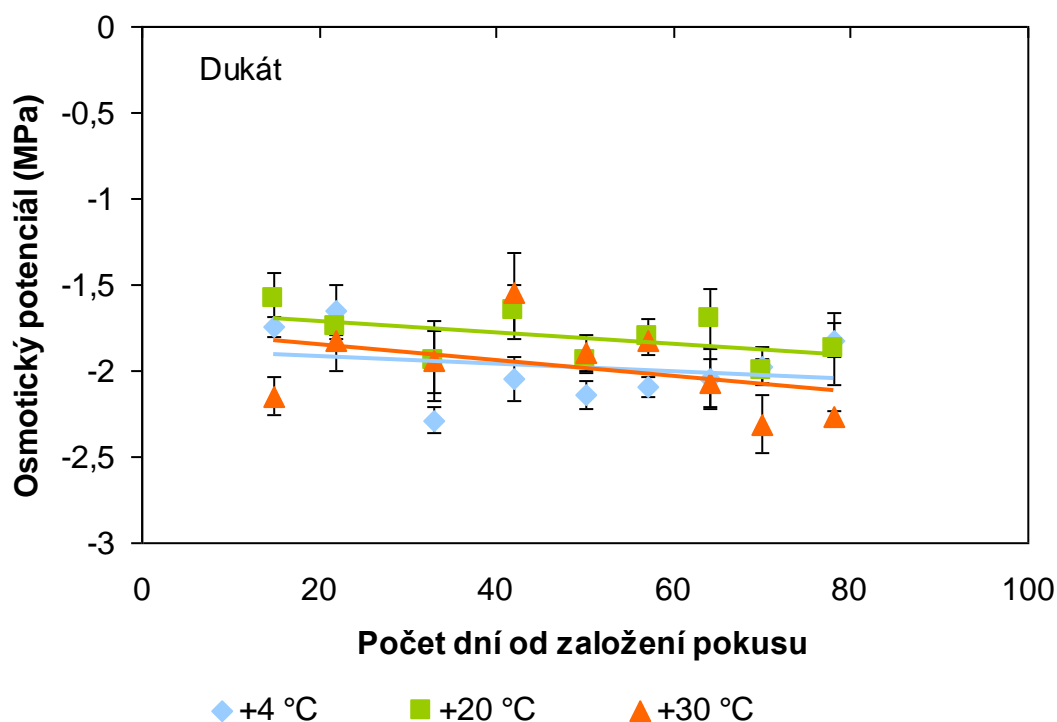
Vliv teploty skladování je zobrazen na Obr. 29, kde je znázorněný růst rostlin v časové závislosti. Pacibulky byly postupně vysazovány do rašelinového substrátu a byl sledován jejich růst. Nejlepší výsledky byly dosaženy při skladovací teplotě +4 °C. Rostliny poměrně brzy vystoupily z dormantního období a začaly prorůstat, na Obr. 30 je počet rostoucích rostlin jednotlivých genotypů, které byly hodnoceny. Při vysoké teplotě skladování (+30 °C) pacibulky všech genotypů prorůstaly velmi pomalu a jejich maximum optimálního růstu bylo výrazně zkráceno. Nejvhodnější dobou pro výsadbu pacibulek se ukazuje období mezi druhou polovinou října a první polovinou prosince, kdy již došlo k porušení dormance. V této době se obvykle česnek vysazuje také na pole. Pěstitelé česneku radí, že výsadba stroužků česneku by neměla být předčasná z důvodu napadení česneku především fusariosou hnilobou a teplota půdy by měla trvale klesnout pod 9 °C (Kozák, 2011).



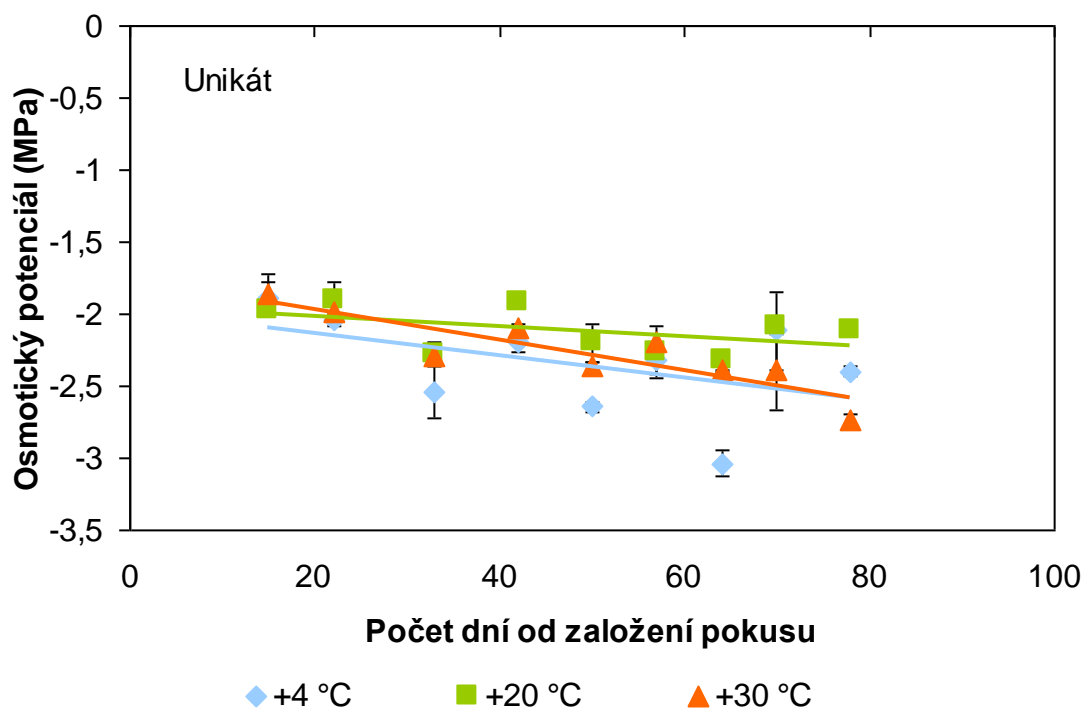
Obrázek 30. Vliv teploty na skladování cibulek *Allium sativum* Cibulky byly skladovány při teplotách +4, +20, +30 °C. Hodnocení růstu bylo provedeno sčítací metodou rostoucích rostlin v rašelinovém substrátu po 3 týdnech od výsadby. Nejvyšší procento prorůstání bylo zjištěno u cibulek skladovaných při +4 °C.



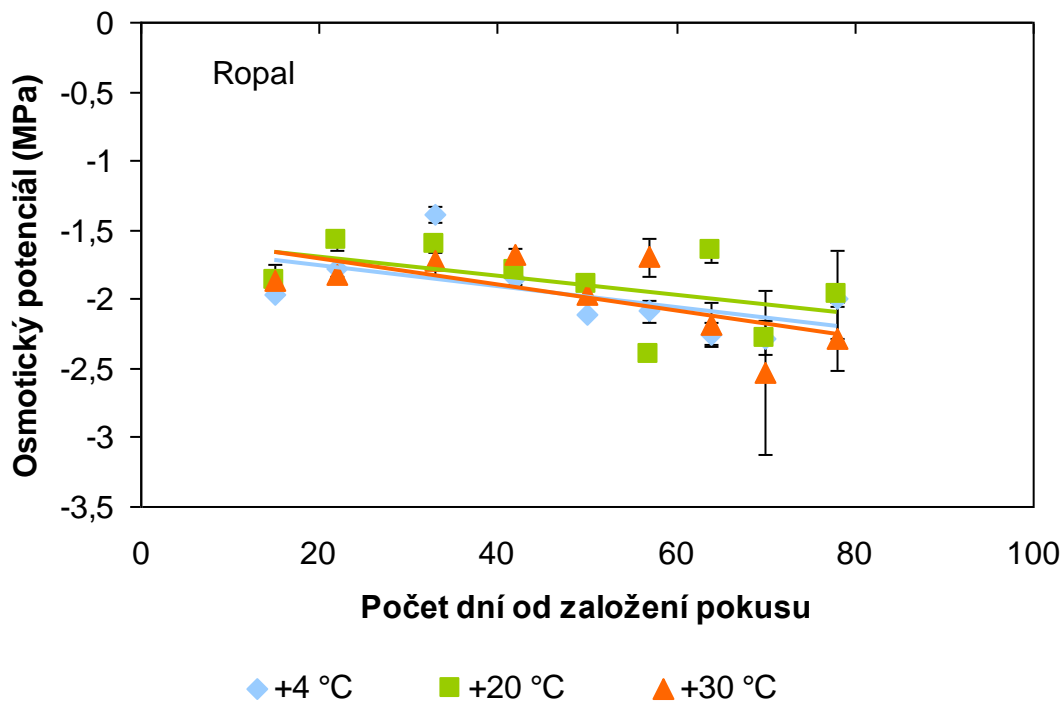
Obrázek 31. Osmotický potenciál stanovený pro cibulky genotypu Djambul2, které byly skladovány po dobu 80 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy korelační přímky. Směrodatné odchylky byly vypočteny ze třech opakování.



Obrázek 32. Osmotický potenciál stanovený pro pacibulky genotypu Dukát, které byly skladovány po dobu 80 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy korelační přímky. Směrodatné odchylky byly vypočteny ze třech opakování.



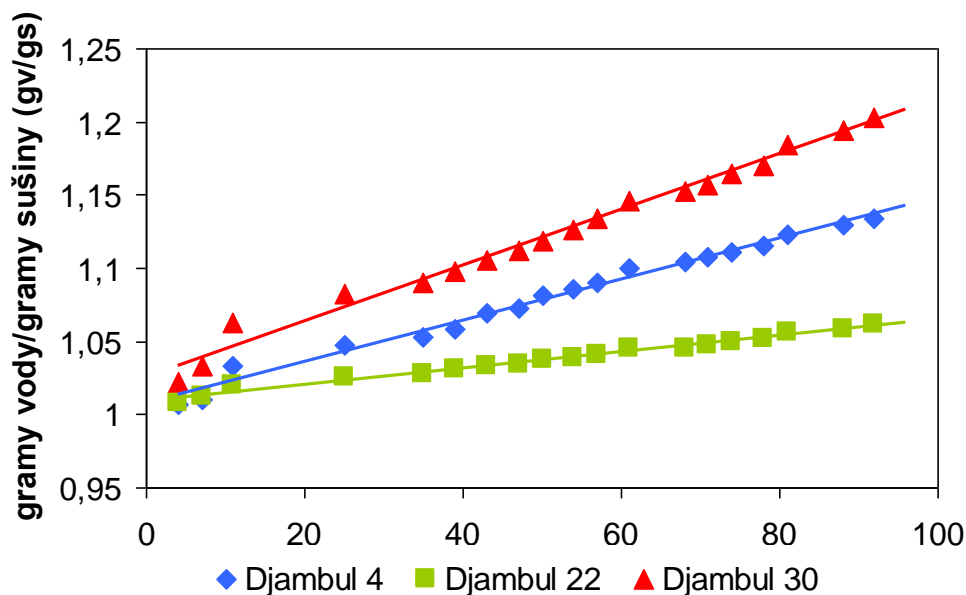
Obrázek 33. Osmotický potenciál stanovený pro pacibulky genotypu Unikát, které byly skladovány po dobu 80 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy korelační přímky. Směrodatné odchylky byly vypočteny ze třech opakování.



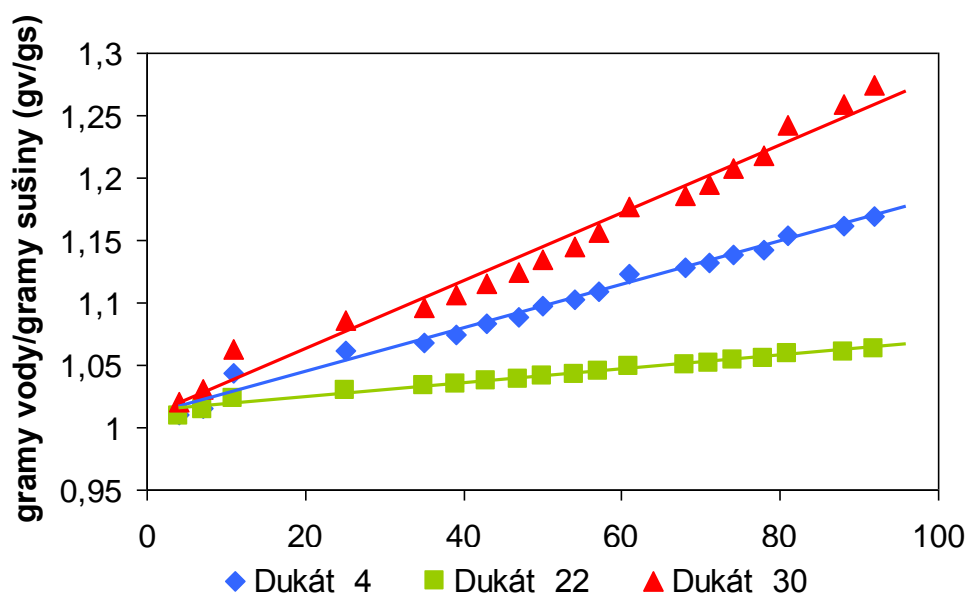
Obrázek 34. Osmotický potenciál stanovený pro pacibulky genotypu Ropal, které byly skladovány po dobu 80 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy korelační přímky. Směrodatné odchylky byly vypočteny ze třech opakování.

Osmotický potenciál stanovený v pacibulkách u čtyřech genotypů rostlin (Djambul2, Dukát, Unikát a Ropal) ukazuje na změny, které probíhají při postupné dehydrataci rostlin během skladování (Obr. 31, 32, 33 a 34). Hodnoty osmotického potenciálu v rámci genotypů klesaly v pořadí Djambul2 (zde byl zaznamenán nejvýznamnější pokles osmotického potenciálu při všech sledovaných teplotách skladování (Obr. 31), dosahoval téměř dvojnásobné hodnoty), Unikát (Obr. 33), Ropal (Obr. 34) a Dukát (Obr. 32). Právě genotyp Dukát vykazoval nejmenší změny osmotického potenciálu a to ve všech teplotních variantách. S ohledem na relativní vzdušnou vlhkost při skladování pacibulek česneku docházelo k nejvýznamnějším změnám při teplotě skladování +30 °C. Hodnoty relativní vzdušné vlhkosti při +30 °C se pohybovaly v rozmezí 10-20 %, tedy byly nejnižší, proto mohly být změny osmotického potenciálu ovlivněny silnější dehydratací vzorků. Relativní vzdušná vlhkost, která byla měřena při 20 °C, dosahovala hodnot 45-50 %. Naměřené hodnoty relativní vzdušné vlhkosti při +4 °C byly v rozpětí 35-45 %. Osmotický potenciál česneku kultivovaného na různě koncentrovaném MS médiu (10-200 % solí MS média) dosahoval hodnot od -0,6 do -1,4 MPa, čím vyšší koncentrace solí v médiu, tím byl osmotický potenciál

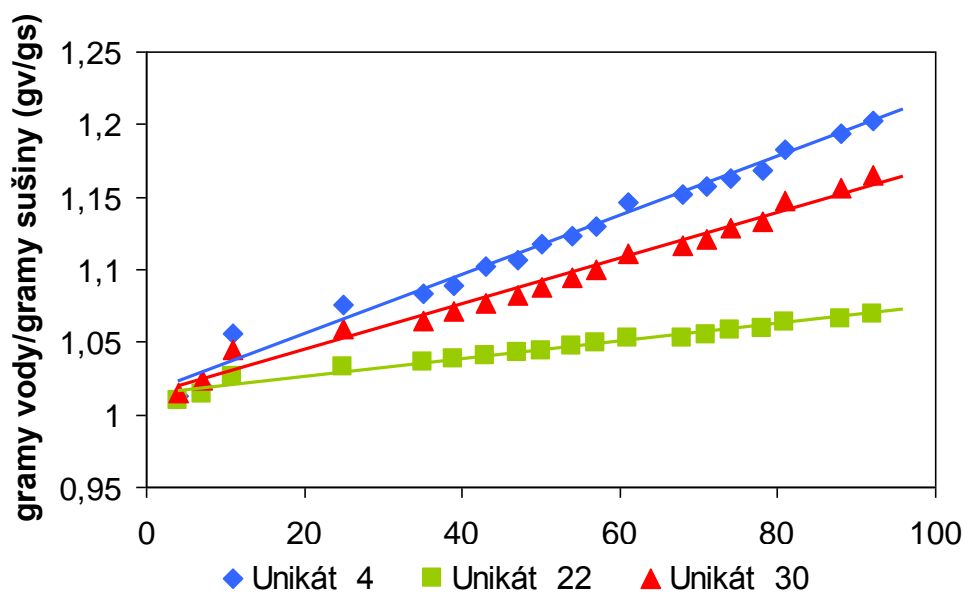
nižší (Ikeda *et al.*, 2002). Podobný trend v hodnotách osmotického potenciálu byl zaznamenán u planiky (Navarro *et al.*, 2007) a také v této práci, s delší dobou skladování se snižoval osmotický potenciál.



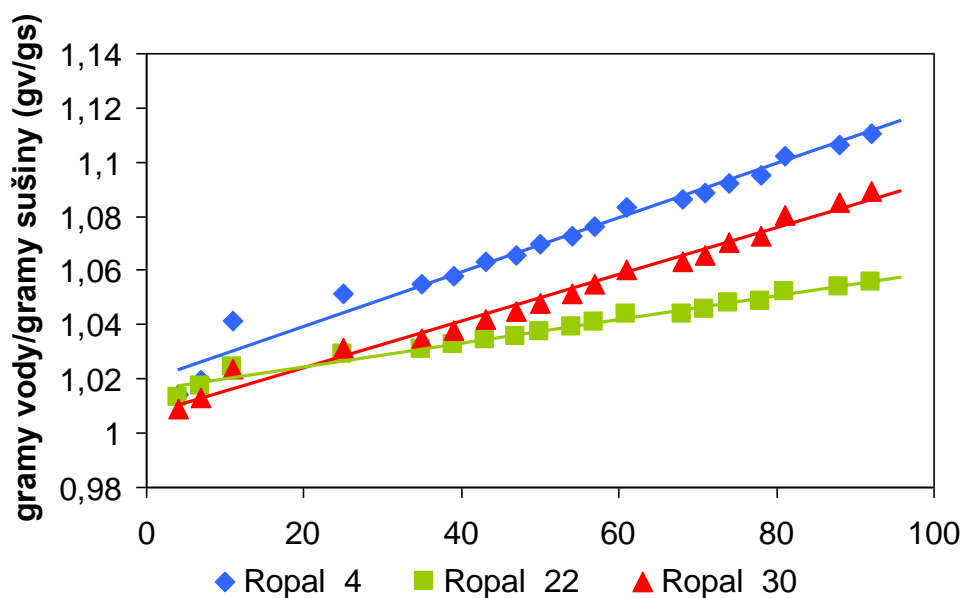
Obrázek 35. Gramy vody vztahované na gramy sušiny stanovené pro pacibulky genotypu Djambul2, které byly skladovány po dobu 96 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy lineární korelační přímky. Kritická hodnota výběrového korelačního koeficientu pro genotyp Djambul2 při +4 °C byl 0,987, při 20 °C 0,984 a při teplotě +30 °C byl 0,987 vysoce významný na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.



Obrázek 36. Gramy vody vztahované na gramy sušiny stanovené pro pacibulky genotypu Dukát, které byly skladovány po dobu 96 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy lineární korelační přímky. Kritická hodnota výběrového korelačního koeficientu pro genotyp Dukát při +4 °C byl 0,988, při 20 °C 0,978 a při teplotě +30 °C byl 0,979 významný na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.



Obrázek 37. Gramy vody vztažené na gramy sušiny stanovené pro pacibulky genotypu Unikát, které byly skladovány po dobu 96 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy lineární korelační přímky. Kritická hodnota výběrového korelačního koeficientu pro genotyp Unikát při +4 °C byl 0,986, při 20 °C 0,976 a při teplotě +30 °C byl 0,984 významný na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.



Obrázek 38. Gramy vody vztažené na gramy sušiny stanovené pro pacibulky genotypu Ropal, které byly skladovány po dobu 96 dnů při teplotách +4, +20, +30 °C. Vypočtenými hodnotami byly proloženy lineární korelační přímky. Kritická hodnota výběrového korelačního koeficientu pro genotyp Ropal při +4 °C byl 0,986, při 20 °C 0,979 a při teplotě +30 °C byl 0,976 významný na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.

Přepočtené hodnoty obsahu vody na gramy vody v poměru ku gramům sušiny mají ve všech variantách stoupající trend (Obr. 35, 36, 37 a 38). Obsah vody v pacibulkách se při

skladování snížil u všech genotypů. Nejvyšší snížení bylo zaznamenáno u genotypu Dukát (76,8 %) při teplotě skladování +30 °C po čtyřech měsících (Obr. 36). Genotyp Ropal (Obr. 38) si po čtyřech měsících skladování při +30°C zachoval nejvyšší obsah vody (91,1 %). Genotypy Unikát (Obr. 37) a Djambul2 (Obr. 35) snížily obsah vody při +30 °C (Unikát 84,7 % obsahu vody, Djambul2 82,1 % obsahu vody). Obsah vody stanovený při skladování v teplotě +20 °C byl u všech sledovaných genotypů velmi vyrovnaný, a to Djambul2: 93,9 %, Dukát: 93,7 %, Unikát: 93,1 % a Ropal: 94,4 %. Po čtyřech měsících skladování pacibulek v teplotě +4 °C bylo dosaženo rozdílných výsledků. Signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P = 0,05$ v obsahu vody byl nalezen mezi pacibulkami genotypu Unikát (82,2 %) a Ropal (89,5 %). Genotyp Dukát (84,7 %) a Djambul2 (87,4 %) měly prokazatelný rozdíl na hladině významnosti $P = 0,1$ v obsahu vody. Obsah vody v pacibulkách koreloval s osmotickým potenciálem. Závislost obsahu vody na čase měla klesající trend stejně tak jako osmotický potenciál ve všech sledovaných variantách. Na velikosti poklesu obsahu vody závisí úroveň regenerace rostlin. Při vysoké ztrátě vody dochází ke snižování životaschopnosti a regenerace a tím je ovlivněna úspěšnost kryoprezervace. Byla potvrzena hypotéza o vlivu teploty na délku dormance pacibulek. Nejvhodnější teplota pro skladování byla určena teplota +4 °C pro všechny genotypy.

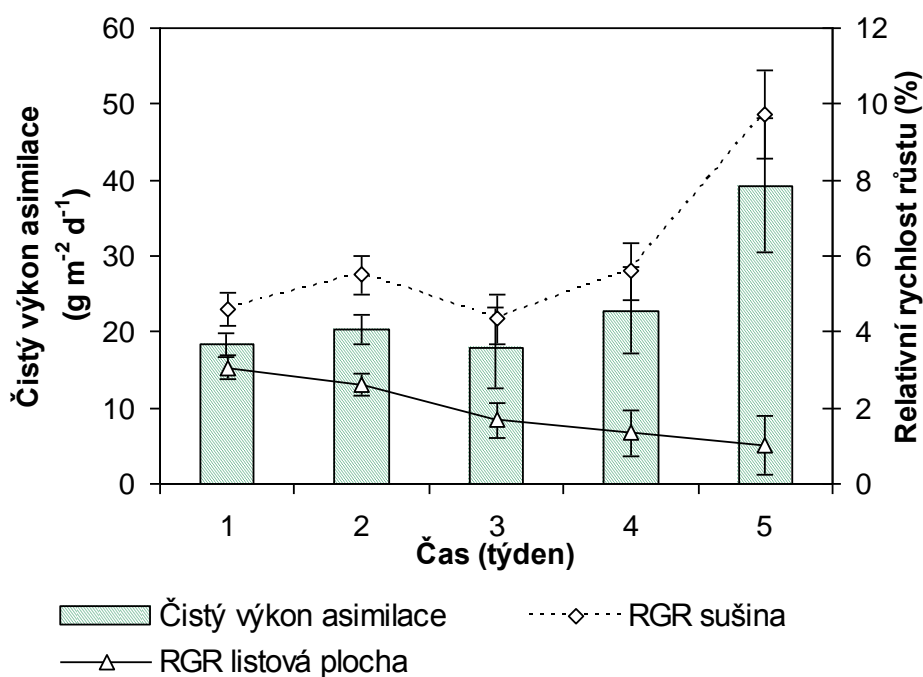
Dosažené výsledky splnily dílčí cíl charakteristiky vnějších podmínek působících na fyziologické vlastnosti rostlin česneku. Vnější podmínky byly upraveny optimalizací kultivační teploty na 20 °C, obsahem sacharózy v kultivačním médiu o koncentraci 15 g l⁻¹ vedoucí ke zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci. Vliv vnějších podmínek na růst rostlin byl potvrzen na třech genotypech česneku. Mrazovými testy byla potvrzena hypotéza rozdílnosti odolnosti rostlin česneku vůči mrazu, avšak nepotvrdila se hypotéza o vlivu otužování rostlin a tím zvýšení jejich odolnosti vůči mrazu. Hypotéza vlivu teploty na délku dormance pacibulek byla potvrzena na čtyřech genotypech česneku.

5.2 Fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů

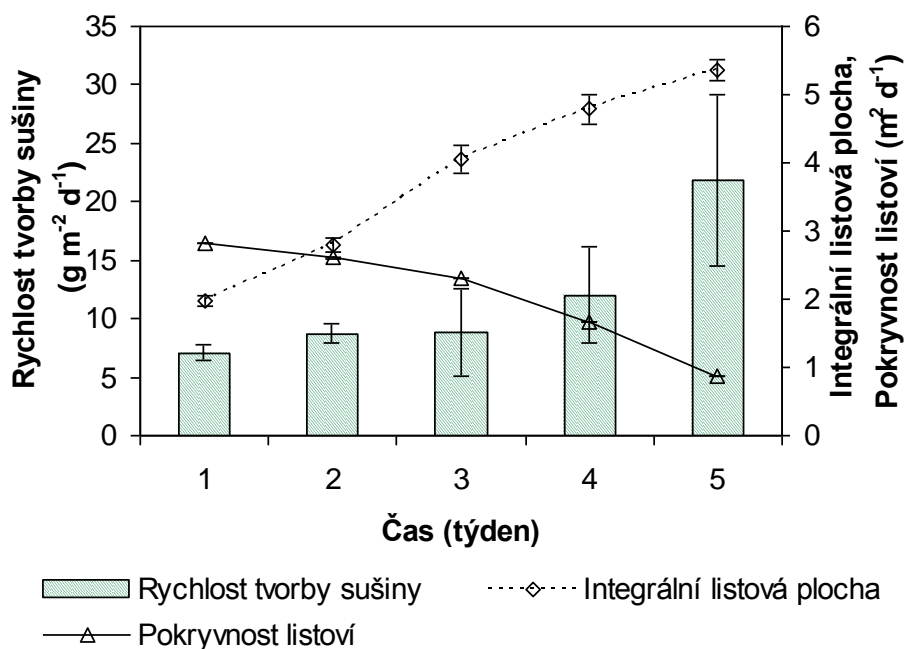
5.2.1 Růstové charakteristiky

Růstové charakteristiky rostlin *Allium sativum* pomocí čistého výkonu asimilace, relativní rychlosti růstu sušiny a listové plochy pomohla odhalit základní principy růstu rostlin v *in vitro* podmínkách. Čistý výkon asimilace (NAR) měl nejvyšší nárůst hodnot mezi

čtvrtým a pátým týdnem kultivace (Obr. 39), vyjadřuje nárůst produktivity asimilačního aparátu rostlin. Mírný počáteční nárůst (z 18,3 na 20,3 g m⁻² den⁻¹) odpovídá rychlosti růstu listové plochy v gramech vztažené na jednotku listové plochy, v průběhu třetího týdne došlo k postupnému zasychání špiček starších listů, tedy snížení listové plochy, a tím došlo k poklesu (17,9 g m⁻² den⁻¹) čistého výkonu asimilace. K výraznému zvýšení NAR došlo s nárůstem nových listů v pátém týdnu (39,3 g m⁻² den⁻¹). V této práci bylo prvně použito růstové charakteristiky pomocí hodnot NAR na rostlinách česneku kultivovaných v *in vitro* podmínkách, proto nebylo možné použít srovnání této charakteristiky s rostlinami česneku. Kubota a Kozai (1992) popisují pomocí zvyšujícího se čistého výkonu asimilace (NAR) růstové charakteristiky u bramboru kultivovaného v *in vitro* podmínkách a změny koncentrace CO₂ v kultivačních nádobách. Hlavním zdrojem uhlíku rostlin v *in vitro* podmínkách není fotosyntéza, ale sacharóza obsažená v kultivačním médiu (Kotková *et al.*, 2012b). Relativní rychlost růstu sušiny (RGR RW) rostlin *Allium sativum* se zvyšovala v závislosti na čistém výkonu asimilace (NAR), nejvyšší nárůst RGR RW byl zaznamenán v pátém týdnu (9,7 %). Relativní rychlost růstu asimilační plochy (RGR RA) se vzhledem k velikosti listové plochy (LAI) snižovala (ze 3,1 na 1,0 %). Relativní rychlost růstu sušiny se po šesti týdnech kultivace rajčat v *in vitro* podmínkách využívá k charakterizaci vlivu zasolení Aazami *et al.* (2010). Podobně i v naší práci došlo ke snížení relativní rychlosti růstu. Rychlost tvorby sušiny (C) narůstala po celou dobu sledování (Obr. 40), rapidní nárůst tvorby sušiny byl zaznamenán s nárůstem nových listů v pátém týdnu s rychlostí 21,9 g m⁻² den⁻¹. Pokryvnost listová (LAI) poukazuje na hustotu porostu, která se zvyšovala s nárůstem listové plochy a tvorbou sušiny. Integrovaná listová plocha (LAD) se v prvních dvou týdnech mírně snižovala (ze 2,8 na 2,6 m² den⁻¹), ve třetím týdnu byl zaznamenán zlom (2,3 m² den⁻¹), kdy došlo k nárůstu nových listů. Poté došlo k prudkému poklesu (1,7 m² den⁻¹) integrovaná listové plochy v důsledku nárůstu hmotnosti sušiny.



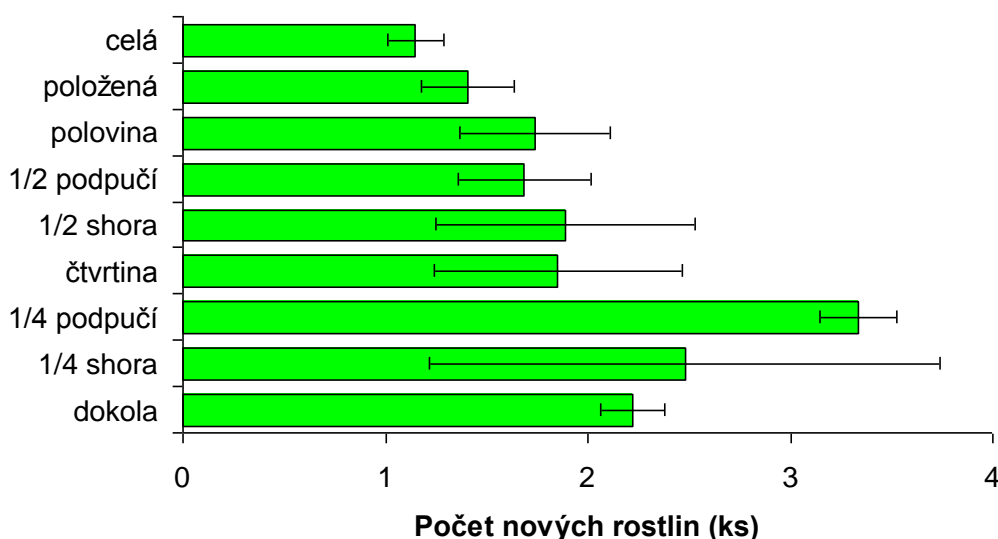
Obrázek 39. Růstové charakteristiky rostlin genotypu Djambul2 pěstovaných v *in vitro* podmínkách při 20 ± 1 °C, čistý výkon asimilace (NAR) a relativní rychlosti růstu (RGR) v době kultivace. Šrafovaný sloupec – čistý výkon asimilace (NAR); prázdný kosočtverec – relativní rychlost růstu sušiny (RGR RW); prázdný trojúhelník – relativní rychlost růstu asimilační plochy (RGR RA); chybové úsečky – vypočítané směrodatné odchylky ze třech opakování.



Obrázek 40. Rychlost tvorby sušiny (C) rostlin genotypu Djambul2 v *in vitro* podmínkách, pokryvnost listová (LAD) a integrální listová plocha (LAI) v čase. Šrafovaný sloupec – rychlost tvorby sušiny (C); prázdný kosočtverec – pokryvnost listová (LAD); prázdný trojúhelník – integrální listová plocha (LAI); chybová úsečka – směrodatná odchylka vypočtená ze třech experimentálních opakování.

5.2.2 Zvýšení multiplikačního koeficientu rostlin

Multiplikace rostlin byla provedena pouze na genotypu Djambul2, a to z důvodu potřeby vysokého počtu vstupního rostlinného materiálu. Vliv mechanické stimulace podpučí rostlin česneku na tvorbu nových rostlin uvádí Obr. 41. Způsob nařezávání podpučí ze spodní strany na čtvrtiny tak, aby se stimuloval vzrostný vrchol k tvorbě nových rostlin, se ukázal jako nejvhodnější varianta pro multiplikaci rostlin česneku bez použití růstových regulátorů. Maximální počet rostlin, kterého bylo dosaženo pomocí mechanické stimulace vzrostného vrcholu česneku, byl počet více než 4 nové rostliny z jedné mateřské rostliny. Podobného výsledku bylo dosaženo při stejném způsobu nařezávání, ale pouze na dvě poloviny, kdy bylo dosaženo hodnoty multiplikačního koeficientu 3. V ostatních variantách nebylo mechanické poškození podpučí česneku významné ve srovnání s kontrolní variantou bez poškození.

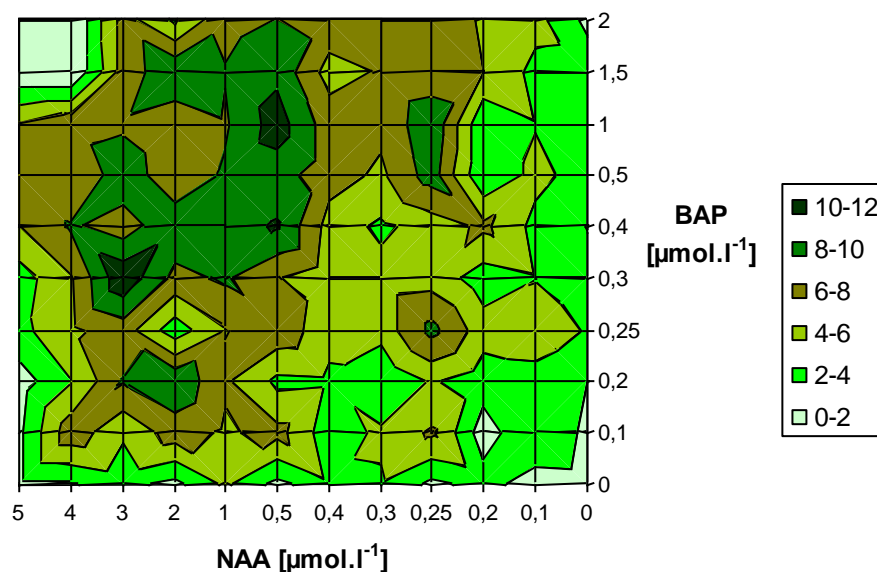


Obrázek 41. Mechanická stimulace podpučí rostlin *Allium sativum* jako stimulační prvek pro růst a tvorbu nových rostlin. Uvedené hodnoty v grafu jsou dosažené hodnoty multiplikačního koeficientu pro danou variantu. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování, v každé variantě bylo použito 10 rostlin česneku. Celá - kontrolní nepoškozený vzrostný vrchol česneku; položená - vzrostný vrchol česneku položený na kultivační médium; polovina - rozdělený vzrostný vrchol česneku na dvě podélné poloviny; 1/2 podpučí - naříznuté podpučí na polovinu; 1/2 shora - shora naříznutý vzrostný vrchol česneku; čtvrtina - podélně rozdělený vzrostný vrchol česneku na čtyři díly; 1/4 podpučí - naříznuté podpučí na čtvrtiny; 1/4 podpučí - naříznutý vzrostný vrchol česneku; dokola - 5-6x naříznutý vzrostný vrchol česneku na bázi.



Obrázek 42. Rostliny genotypu 'Djambul2' v *in vitro* podmínkách, A: kontrolní, B: mechanická stimulace, C: stimulace pomocí růstových regulátorů NAA a BAP (foto autor).

Porovnání multiplikace rostlin znázorňuje obrázek 42, na kterém jsou rostliny *Allium sativum* L. genotypu 'Djambul2', které byly množeny pomocí mechanické stimulace a dále pomocí růstových regulátorů. Kontrolní rostliny byly bez známek poškození a nemnožili se. Rostliny, které byly mechanicky stimulovány k růstu nařiznutím podpučí, měly tendenci k tvorbě nových rostlin. Nejvýrazněji byly tyto výsledky patrné na rostlinách, kde byly aplikovány růstové regulátory. Rostliny v kombinacích růstových regulátorů $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP a $0,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA a zároveň $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP a $3 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA tvořily nové rostlin v *in vitro* podmínkách. Rostliny tvořily jak nadzemní části, tak také kořenily. Při nadměrné koncentraci růstového regulátoru NAA docházelo k významnému nárůstu kořenové části. Kořeny byly ztloustlé, nadzemní část nejevila známky poškození. Zasychání špiček listů je známkou vyčerpaného kultivačního média, v tomto případě je potřeba namnožené rostliny od sebe oddělit a přesadit na nové čerstvé kultivační médium.



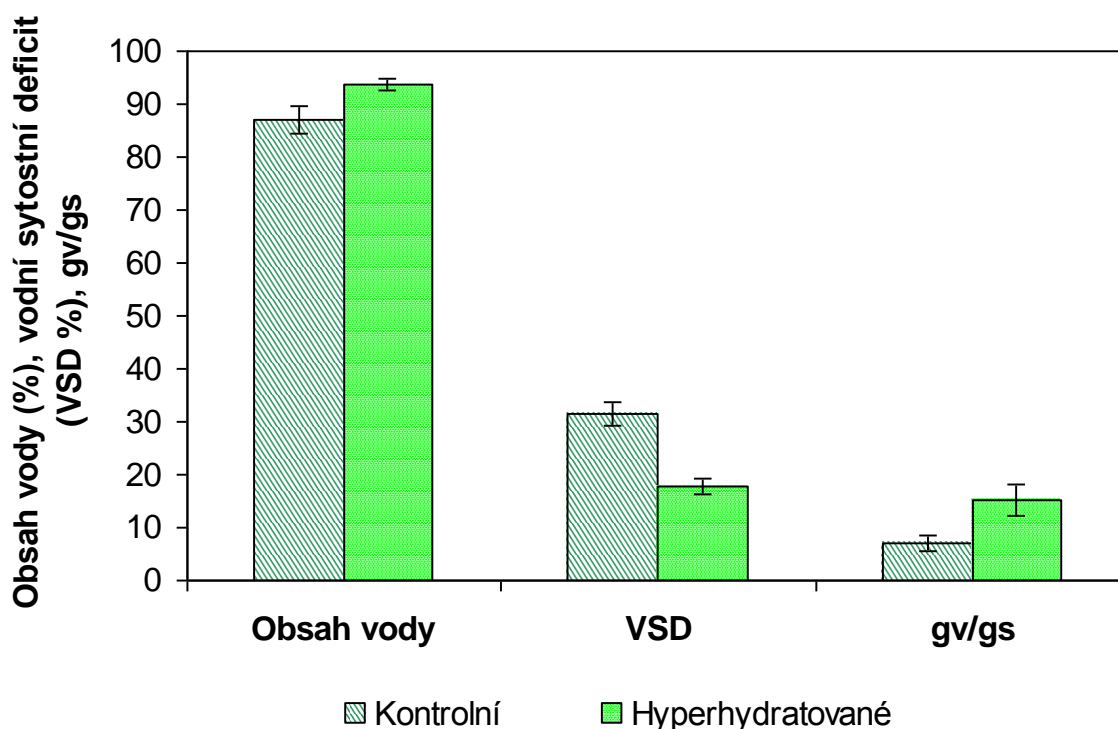
Obrázek 43. Stanovení multiplikačního koeficientu (0 –12) rostlin *Allium sativum* pěstovaných v *in vitro* podmínkách při teplotě 20 ± 1 °C pomocí různých koncentrací růstových regulátorů auxinu NAA a cytokininu BAP.

Hodnoty multiplikačního koeficientu rostlin česneku získané kombinacemi růstových regulátorů uvádí Obr. 43. Nejvýznamnější oblastí z pohledu multiplikace rostlin česneku je koncentrace $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP a $3 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, kde byl zjištěn průměrný počet 12 nových rostlin z jedné rostliny. Nejvyššímu počtu nově narostlých rostlin česneku odpovídají koncentrace $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP a $0,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, kdy narostlo v průměru 11 nových rostlin z jedné výchozí rostliny. Třetí oblast výskytu vyššího růstu rostlin *de novo* se nachází při koncentraci $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ BAP a $0,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA (více než 10 nových rostlin z jedné rostliny). Kim *et al.* (2003) použili tekuté médium s kombinací růstových regulátorů 2-iP ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) a NAA ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$) pro multiplikaci rostlin česneku, kde dosáhli až 15 rostlin v subkultivačním intervalu 9 týdnů. V oblasti koncentrace růstových regulátorů s nízkým obsahem NAA byl počet nově narostlých jedinců velmi nízký (0–4 rostliny). Obohacené médium s růstovými regulátory BAP ($< 0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$) a NAA ($< 0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$) o vyšších koncentracích bylo pro růst nových rostlin velmi podpůrné, počet rostlin se pohyboval nad hodnotou multiplikačního koeficientu 6. Růstový regulátor NAA o koncentraci $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ měl negativní vliv na tvorbu a růst nových rostlin. Pro multiplikaci česneku je podle Roksana (2002) nejvhodnější kombinace růstových regulátorů 2-iP ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$), NAA ($0,25 \text{ mg l}^{-1}$) a BAP ($1,5 \text{ mg l}^{-1}$). Boltenkov a Zarembo (2005) uvádí jako nejvhodnější koncentrace pro množení česneku $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA a 2 mg l^{-1} BAP. Ellis *et al.* (2006), Fereol *et al.* (2005) a

Kim *et al.* (2006b) dosahují 5,3–7,1 % regenerace rostlin po kryoprezervaci a 60–80 % tvorby pacibulek pomocí růstových regulátorů NAA, BAP a IBA. Práce Xu *et al.* (2008) se téměř shoduje s našimi výsledky, kdy dochází v oblasti s koncentrací růstových regulátorů 1 mg l⁻¹ NAA a 1 mg l⁻¹ BAP k nejvyššímu počtu (17) nových rostlin.

5.2.3 Hyperhydratace, obsah vody a obsah chlorofylů

Dalšími faktory, které ovlivňovaly růst rostlin v *in vitro* podmínkách, byly obsah vody v pletivech rostlin a obsah fotosynteticky aktivních pigmentů v listech rostlin. Naměřené hodnoty celkového obsahu vody, vodního sytostního deficitu a vypočtené hodnoty gv/gS (gramy vody / gramy sušiny) v pletivech kontrolních rostlin a rostlin, které měly abnormální růst zapříčiněný hyperhydratací pletiv, znázorňuje Obr. 44.



Obrázek 44. Obsah vody (%), vodní sytostní deficit (VSD, %) a vypočtené hodnoty gv/gS (gramy vody / gramy sušiny) u hyperhydratovaných a kontrolních rostlin *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách kultivovaných při teplotě 20±1 °C. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování.

Z obrázku 44 je patrné, že rostliny, které mají hyperhydratovaná pletiva dosahují vyšší hodnoty obsahu vody (93,6 ± 2 %) oproti rostoucím kontrolním rostlinám *Allium*

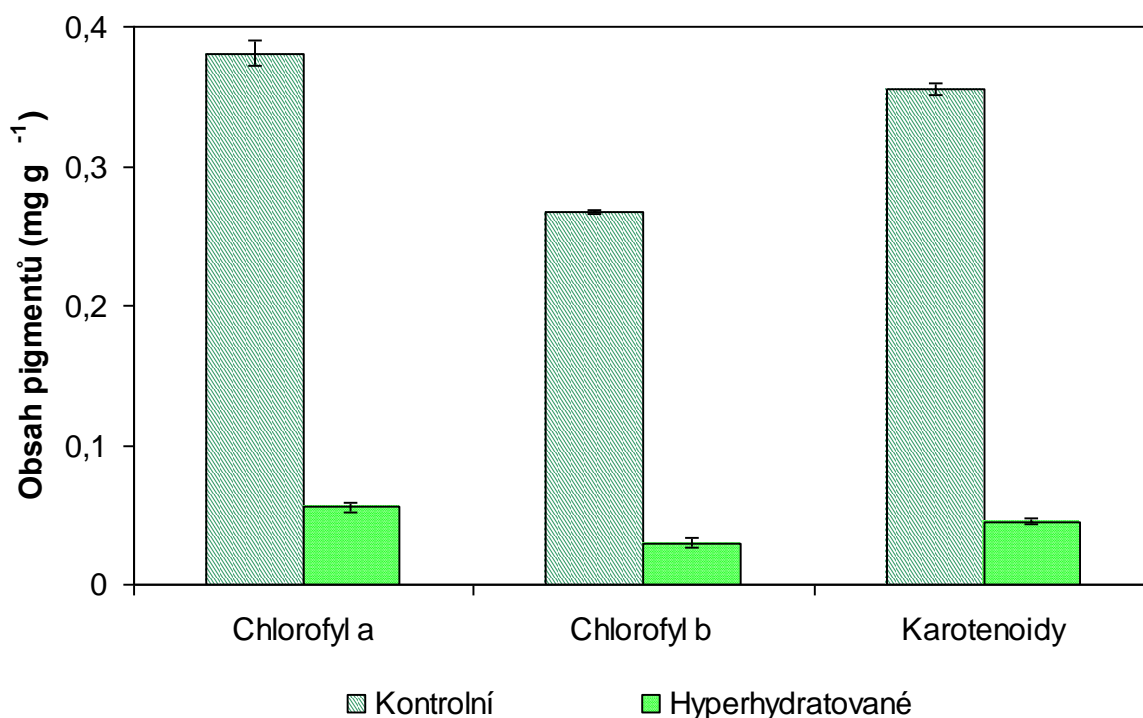
sativum ($87,0 \pm 1 \%$). Získané hodnoty pro rostliny s hyperhydratovanými pletivy byly statisticky významně odlišné od hodnot naměřených u kontrolních rostlin s normálním růstem na hladině významnosti $P = 0,05$. Pro hodnocení vodního sytostního deficitu jsou definovány tři kategorie, do 20 % VSD označuje za provozní, v rozmezí 20–40 % VSD se jedná o fázi vadnutí a nad 40 % VSD hodnotí jako fázi zasychání. Z toho lze usoudit, že hyperhydratovaná pletiva jevila známky života, měla zachovaný metabolismus, avšak nebyla vitální. Skupina kontrolních rostlin česneku se tedy podle tohoto členění dostala do fáze vadnutí. Bylo tedy vhodné tyto rostliny pasážovat na nové kultivační médium. Vyšší obsah vody může vyvolat antioxidační reakci, která může vést k poškození buněk, narušení metabolické funkce až ztrátě buněčné integrity (Wu *et al.*, 2009). Získané hodnoty obsahu vody ukazují na poměr vody a sušiny v rostlině. U hyperhydratovaných rostlin byl nalezen vyšší poměr v gramech vody na gramy sušiny než u kontrolních rostlin, tato skutečnost koreluje se zjištěným vysokým obsahem vody právě u hyperhydratovaných rostlin. Bylo prokázáno, že hyperhydratované rostliny obsahovaly vyšší procento vody v pletivech oproti kontrolním rostlinám.

Ze získaných výsledků je patrné, že koncentrace fotosyntetických pigmentů u varianty s kontrolními rostlinami, bez poškození hyperhydratací dosahují vyšších hodnot (Obr. 45). Tyto rostliny česneku obsahují poměrně vysoký podíl karotenoidů ($0,355 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$). Vyšší obsah (a to až o $0,025 \text{ mg g}^{-1}$) je potom u chlorofylu a, kde dosahuje $0,381 \pm 0,007 \text{ mg g}^{-1}$. Porovnáme-li hodnoty chlorofylu b a karotenoidy, potom můžeme sledovat až o čtvrtinu nižší hodnoty právě u chlorofylu b, kde hodnoty dosahují $0,266 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$ (Obr. 46). Stajner a Varga (2003) sledovali obsah chlorofylů u rostlin česneku v *ex vitro* podmínkách, uvádějí hodnoty pro obsah chlorofylu a $1,64 \text{ mg g}^{-1}$, pro chlorofyl b potom $0,58 \text{ mg g}^{-1}$, pro karotenoidy až $2,57 \text{ mg g}^{-1}$. Poměr obsahu chlorofylů a/b (2,82) v jejich podmínkách byl dvojnásobně vyšší oproti vypočtenému poměru chlorofylů kontrolních rostlin (1,43) stanovených v *in vitro* podmínkách v této práci. Rostliny v *in vitro* podmínkách spotřebovávají uhlík ze sacharózy, který je obsažen v kultivačním médiu. Tím může být způsobený snížený výkon fotosyntézy (Caillot *et al.*, 2009). V experimentu byly porovnány hyperhydratované rostliny, u kterých dosahovaly hodnoty chlorofylu a $0,055 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$, což odpovídá téměř dvojnásobku obsahu chlorofylu b, u kterého byly naměřeny hodnoty $0,029 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$. Obsah karotenoidů u hyperhydratovaných rostlin byl potom stanoven na $0,045 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$.

Výsledky poukazují na skutečnost, že hyperhydratované rostliny vykazovaly statisticky průkazně nižší obsah fotosynteticky aktivních pigmentů oproti rostlinám, které

rostly normálně a nebyly hyperhydratované. Významný vliv má hyperhydratace při regeneraci rostlin po kryoprezervaci. Srovnávací tabulka (Tab. 7) porovnává celkový podíl fotosynteticky aktivních pigmentů u hyperhydratovaných rostlin a kontrolních rostlin česneku. Rozdíl byl téměř osminásobně větší u normálně rostoucích rostlin *Allium sativum* ($0,647 \pm 0,004 \text{ mg g}^{-1}$) oproti hyperhydratovaným, kde celkové hodnoty chlorofylů dosahovaly $0,083 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$.

Vzájemný poměr obsahu chlorofylů a a b byl nalezen vyšší u hyperhydratovaných rostlin (chl. a/b: 1,968), který byl způsoben vyšší degradací chlorofylu b, pravděpodobně v důsledku změn v metabolismu těchto rostlin (Wu *et al.*, 2009). Podíl chlorofylu a a b u varianty s kontrolními rostlinami česneku činil 1,431.



Obrázek 45. Obsah fotosynteticky aktivních pigmentů genotypu Djambul2 (mg g^{-1}) kultivovaných v *in vitro* podmínkách při teplotě $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování. Byl nalezen statisticky průkazný rozdíl obsahu chlorofylů a a b. Významný rozdíl obsahu chlorofylů byl nalezen u kontrolních rostlin i u hyperhydratovaných rostlin na hladině spolehlivosti $P = 0,05$.

Poměr obsahu chlorofylů a a b uvádějí Stajner a Varga (2003) s hodnotou 2,827 a celkový obsah fotosynteticky aktivních pigmentů v rostlinách česneku pěstovaných v *ex vitro* podmínkách potom stanovili na $2,220 \text{ mg g}^{-1}$. Bližší hodnoty našim výsledkům potom stanovili Wu *et al.* (2009), kteří uváděli hodnotu poměru chlorofylů a a b 1,372 a celkový

obsah fotosyntetických pigmentů stanovili na $0,1172 \text{ mg g}^{-1}$ pro normálně vyvinuté, nepoškozené, rostoucí rostliny česneku; u hyperhydratovaných rostlin byl poměr obsahu těchto pigmentů stanoven na 1,433 a celkový obsah fotosynteticky aktivních pigmentů je vyjádřen hodnotou $0,055 \text{ mg g}^{-1}$.

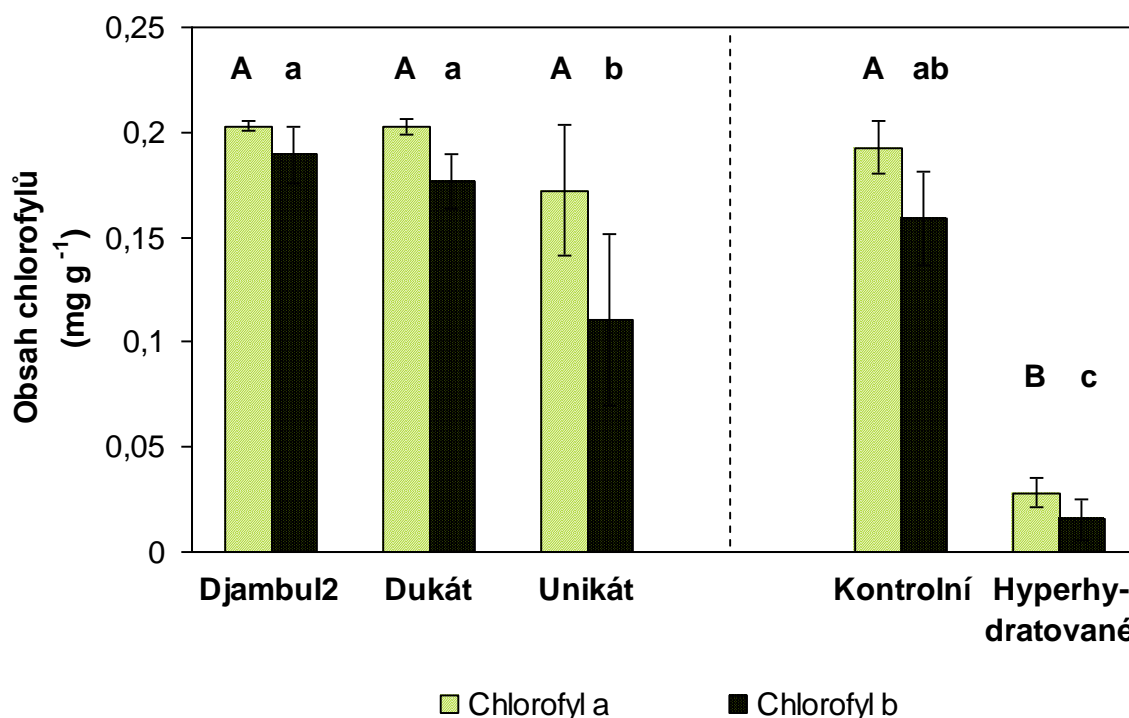
Tabulka 7. Porovnání obsahu fotosynteticky aktivních pigmentů (FAP) rostlin genotypu Djambul2 kultivovaných v *in vitro* podmínkách při teplotě $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ kontrolní a hyperhydratované.

	Kontrola		Hyperhydratované	
	FAP	SD	FAP	SD
Chlorofyl a+b (mg g^{-1})	0,64	0,007	0,08	0,001
Chlorofyl a/b	1,43	0,047	1,96	0,064
Chlorofyl b/a	0,69	0,022	0,51	0,016

Pozn. FAP: fotosynteticky aktivní pigmenty, SD: směrodatná odchylka. Směrodatné odchylky jsou vypočítány ze tří opakování.

Obsah chlorofylu a, který je nutný pro přeměnu energie ve fotosyntéze, byl shodný u genotypů rostlin Djambul2 ($0,203 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$) a Dukát ($0,203 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$), genotyp Unikát ($0,172 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$) měl nižší obsah chlorofylu a (Obr. 22). U hyperhydratovaných rostlin byl nalezen nejnižší obsah chlorofylu a ($0,028 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$) a to více než sedmkrát naproti dvěma nejvyšším hodnotám. Nejvyšší obsah chlorofylu b byl stanoven u genotypu Djambul2 ($0,189 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$), méně potom u genotypu Dukát ($0,176 \text{ mg g}^{-1}$). Obsah chlorofylu b u hyperhydratovaných rostlin ($0,015 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$) byl nižší více než dvanáctkrát oproti rostlinám kontrolním, s normálním růstem, což potvrdilo hypotézu nesprávného metabolismu a poškození rostlin. Podobné hodnoty byly naměřeny v práci Wu *et al.* (2009), kde byl porovnáván obsah chlorofylů pro rostliny česneku s normálním růstem a rostlin hyperhydratovaných (kontrolní chl. a: $0,26 \text{ mg g}^{-1}$, chl. b: $0,14 \text{ mg g}^{-1}$, hyperhydratované chl. a: $0,13 \text{ mg g}^{-1}$, chl. b: $0,079 \text{ mg g}^{-1}$). Poškození hyperhydratovaných rostlin bylo v obou případech potvrzeno sníženým obsahem fotosynteticky aktivních pigmentů. Obsah fotosynteticky aktivních pigmentů uvádí tabulka 7. Nejvyšší obsah chlorofylů a a b byl u genotypu Djambul2, potom u genotypů Dukát a Unikát. Nejnižší obsah chlorofylů a a b byl stanoven u hyperhydratovaných rostlin. Poměr obsahu chlorofylů a a b byl nejnižší u genotypu Djambul2, kdy rostliny byly nejlépe přizpůsobeny kultivaci v *in vitro* podmínkách. Hyperhydratované rostliny měly téměř dvojnásobnou hodnotu poměru obsahu

chlorofylů naproti získaným hodnotám u genotypu Djambul2, to poukazuje na poškození rostlin, které bylo potvrzené úhynem rostlin.



Obrázek 46. Obsah chlorofylů a a b v listech tří genotypů rostlin *Allium sativum*, kontrolní varianta v porovnání s hyperhydratovanými rostlinami pěstovanými v *in vitro* podmínkách. Šrafovaný sloupec: obsah chlorofylu a; plný sloupec: obsah chlorofylu b; chybová úsečka: vypočítaná směrodatná odchylka z trojího opakování; velká písmena odpovídají statistickému hodnocení obsahu chlorofylu a; malá písmena představují statistické hodnocení obsahu chlorofylu b; shodná písmena se statisticky významně neliší na hladině spolehlivosti $P = 0,05$. Genotyp Unikát se významně liší v obsahu chlorofylu b od genotypů Djambul2 a Dukát. Významné rozdíly obsahu obou měřených chlorofylů byly zjištěny u hyperhydratovaných rostlin.

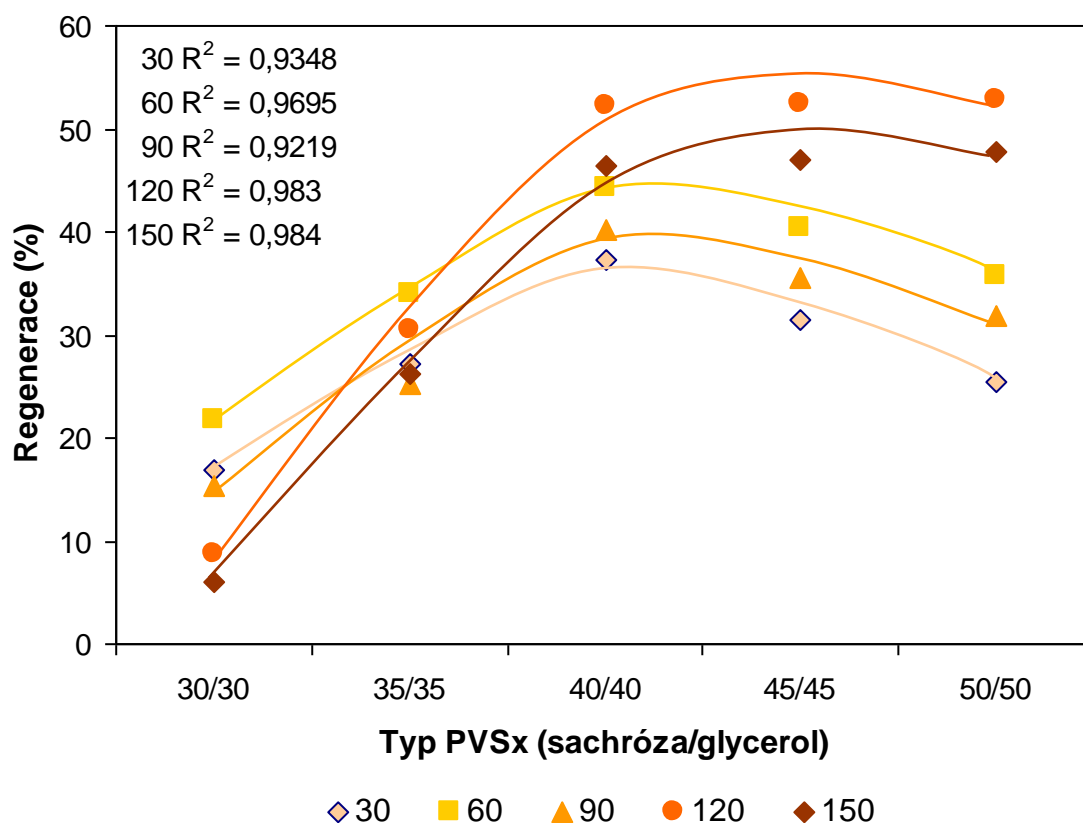
Získané výsledky splnily dílčí cíl, že fyziologické vlastnosti vegetativních orgánů byly na základě růstové analýzy testovány a byla stanovena optimální 6 týdenní délka subkultivace rostlin v *in vitro* podmínkách. Limitace živinami, kdy jsou rostliny závislé na příjmu uhlíku především z kultivačního média, a to ze sacharózy, byla prokázána nárůstem čistého výkonu asimilace (NAR), rychlostí tvorby sušiny (C), relativní rychlostí růstu sušiny (RGR RW), integrální listové plochy (LAI) a snížením relativní rychlosti růstu listové plochy (RGR RA) a pokryvnosti listoví (LAD). Byla potvrzena hypotéza o zvýšení multiplikačního koeficientu rostlin česneku v *in vitro* podmínkách. Potřebný počet rostlin pro kryoprezervaci je 160 ks, tohoto počtu lze dosáhnout multiplikací pomocí mechanické stimulace za 5 period subkultivací, proti tomu lze použít multiplikací pomocí růstových regulátorů, kdy můžeme obdržet požadovaný počet rostlin již během dvou period subkultivace. Negativní vliv

hyperhydratovaných rostlin byl prokázán vysokým obsahem vody v pletivech kultivovaných rostlin česneku v *in vitro* podmínkách. Tato porucha metabolismu může snižovat regeneraci rostlin po kryoprezervaci, proto doporučuji používat pro kryoprezervaci pouze zdravé, vitální rostliny, bez známek jakéhokoliv poškození.

5.3 Optimalizace složení a koncentrace kryoprotektivních látek

5.3.1 Kryoprezervace vzrostných vrcholů česneku

Přežití a regenerace vzrostných vrcholů rostlin česneku po kryoprezervaci je na Obr. 47, z něhož je patrný vliv koncentrace roztoku PVS3_x (sacharóza/glycerol, index x představuje koncentrace PVS3 roztoků 30/30; 35/35; 40/40; 45/45; 50/50 w/v %) na přežití a regeneraci vzrostných vrcholů česneku v časové závislosti po 30 minutách do 150 minut. Působení PVS3_x roztoku po dobu 30 minut má velmi nízký vliv na přežití vzrostných vrcholů po kryoprezervaci a to ve všech variantách. Lze se domnívat, že jde o velmi krátkou dobu působení vitrifikačního roztoku, a proto dochází k nedostatečnému odnětí vody z buněk. Naproti tomu PVS2 má optimální dobu působení v rozmezí nejméně 15 minut, nejdéle však 25 minut (Halmagyi *et al.*, 2005). Optimální doba působení PVS3_x roztoku na přežití a regeneraci vzrostných vrcholů česneku je 120 minut pro všechny sledované varianty. Stejně výsledky při použití vitrifikačního roztoku PVS3 jsou uváděny např. v pracích Benson, (2008), Kim *et al.* (2006b) a Volk *et al.* (2006), zdá se, že čím je širší interval doby dehydratace, tím menší chyby se lze dopustit při kryoprezervaci rostlinného materiálu. Regenerace se zvyšuje se snížením obsahu vody na 27–33 % (Kim *et al.*, 2005). Pro kryoprezervaci vzrostných vrcholů česneku se z hlediska přežití a regenerace rostlin ukazuje jako nejvhodnější koncentrace PVS3_x roztoku 40/40 % (w/v) sacharóza/glycerol, kde bylo po 120 minutách působení roztoku dosaženo 22,3 % přežití a 52,2 % regenerace rostlin (Obr. 48). Tato koncentrace je úspěšně používána při kryoprezervaci rostlinného materiálu např. Reed, (2008), Sakai a Engelmann (2007).

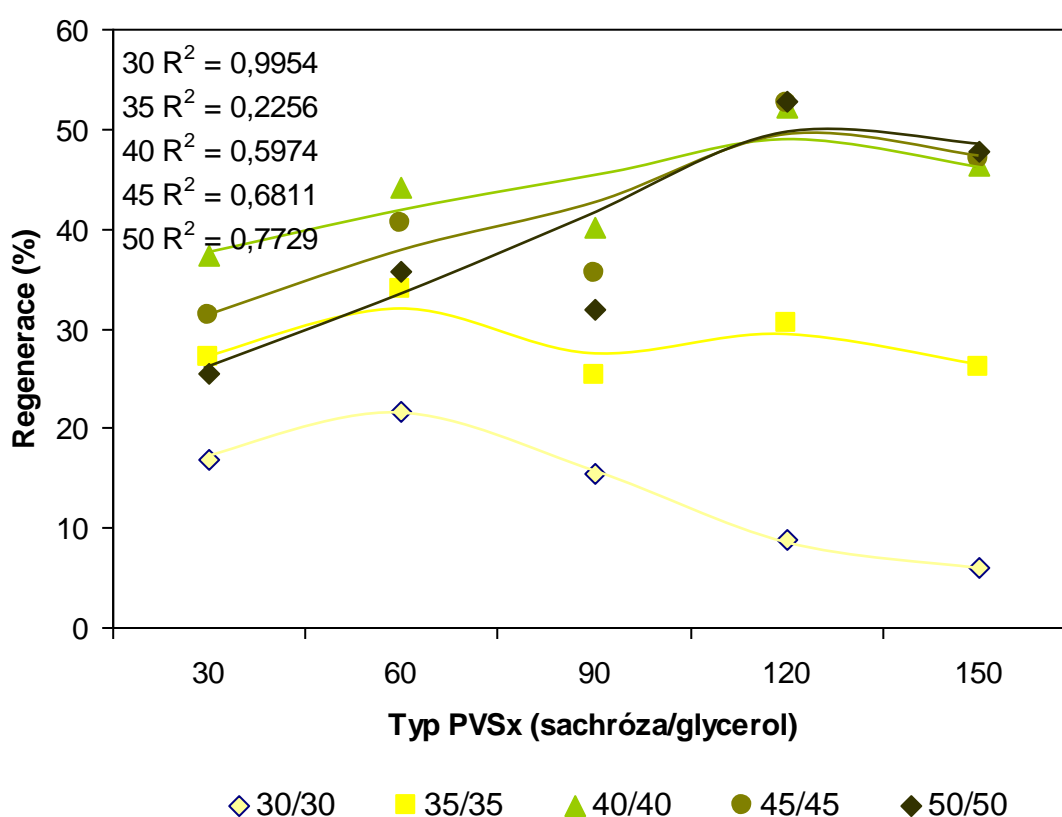


Obrázek 47. Regenerace vzrostných vrcholů česneku genotypu Djambul2 po kryoprezervaci v závislosti na koncentraci PVS_{3x} roztoku v časovém rozmezí 30–150 min. Vzrostné vrcholy byly 24h předkultivovány na MS médiu se zvýšeným obsahem sacharózy, poté byl aplikován LS roztok po dobu 20 min, následně byl vyměněn za PVS_{3x} roztok. Nejvyšší hodnoty byly získány po 120–150 min působení PVS₃ 40/40, 45/45 a 50/50 % (w/v) poměru sacharóza/glycerol. Naměřenými hodnotami byly proloženy korelační křivky a byly vypočteny korelační koeficienty pro jednotlivé časy působení PVS_{3x} roztoků.

Jako nejméně vhodná koncentrace PVS_{3x} roztoku pro kryoprezervaci vzrostných vrcholů česneku se ukázala PVS_{3x} roztoku 30/30 % (w/v) sacharóza/glycerol. Vitrifikační roztok s koncentrací 30/30 % (w/v) sacharóza/glycerol pro kryoprezervaci česneku zatím nebyl publikován, ačkoliv je známa publikace, kde pro kryoprezervaci u různých odrůd jabloní je používána 50/30 % sacharóza/glycerol (w/v) s regenerací rostlin 46 až 55 % (Halmagyi a Pinker, 2006). Kim *et al.* (2004a) uvádí ve své práci srovnání různých kryoprotektivních látek, kde se projevil s nejvyšším přežitím (97,0 %) po zamrazení a s úspěšnou regenerací (80,4 %) standardní vitrifikační roztok PVS3 s koncentrací 50/50 % (w/v) sacharóza/glycerol.

Porovnání použití kryoprotektivních látek (PVS2 a PVS3) při zamrazování popisovali ve své práci Ellis *et al.* (2006), kteří používali jako rostlinný materiál meristematická pletiva česneku extirpovaná ze stroužků a ne z pacibulek. Z 12 genotypů mělo vyšší regeneraci po

použití PVS2 5 genotypů, 4 genotypy zvýšily regeneraci po kryoprezervaci po aplikaci PVS3 a 3 genotypy se projeví téměř shodně. Pomalá dehydratace rostlinných pletiv nastala při působení vitrifikačního roztoku PVS3, a pro dostatečnou ochranu rostlinného materiálu byla nutná minimální doba účinku 120 minut (Kim *et al.*, 2005). Pomocí regenerace rostlin *in vitro* podmínkách bylo testováno pět kryoprotektivních roztoků s různou dobou účinku na vzrostné vrcholy česneku. Koncentrace s obsahem sacharózy a glycerolu nad 40 % w/v se ukázaly jako vhodné pro kryoprezervaci těchto rostlin, a to při době působení na vzrostné vrcholy nejméně 120 minut.

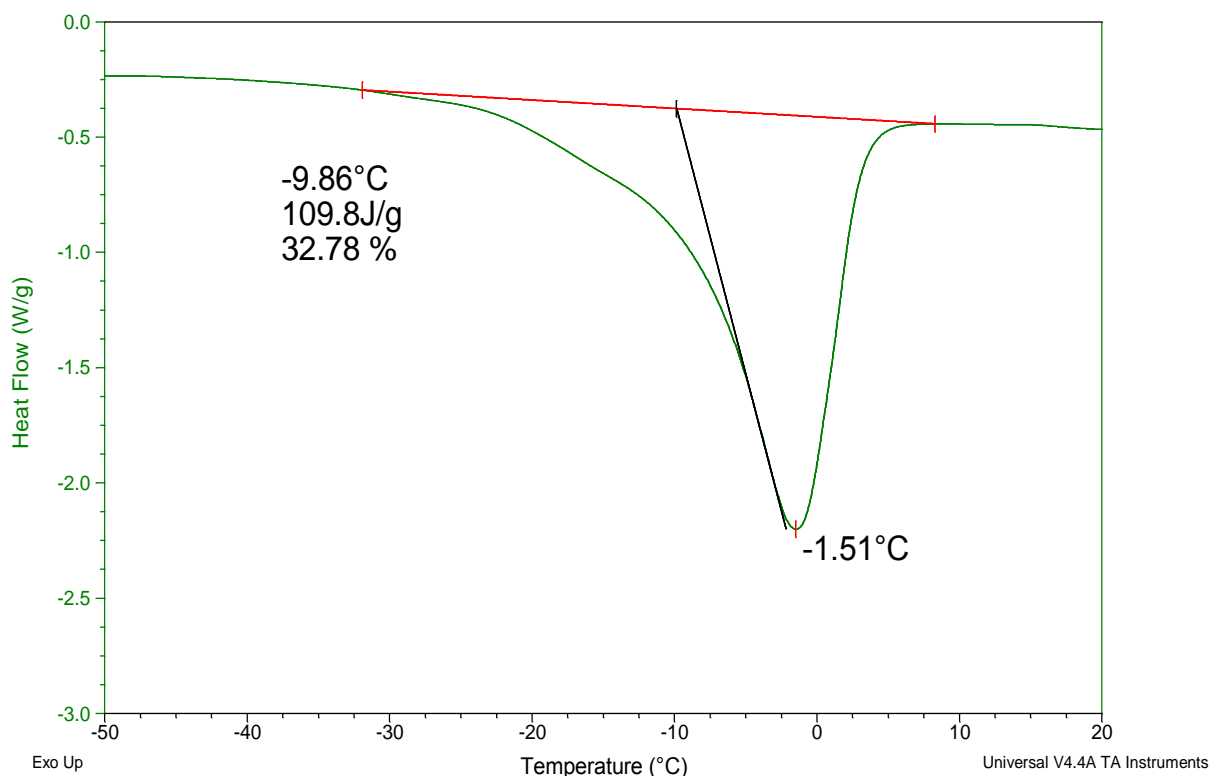


Obrázek 48. Regenerace vzrostných vrcholů česneku genotypu Djambul2 po kryoprezervaci v závislosti na čase (30–150 min), při různé koncentraci PVS3_x roztoku. Vzrostné vrcholy byly 24h předkultivovány na MS médiu se zvýšeným obsahem sacharózy, poté byl aplikován LS roztok po dobu 20 min, následně byl vyměněn za PVS3_x roztok. Nejvyšší hodnoty byly získány po 120 min působení PVS3 40/40, 45/45 a 50/50 % (w/v) sacharóza/glycerol. Hodnotami byly proloženy korelační křivky a byly vypočteny korelační koeficienty pro jednotlivé časy působení PVS3_x roztoků.

5.3.2 Termická analýza

Na obrázku 49 je znázorněno vyhodnocení termogramu při ohřevu čerstvého vzrostného vrcholu česneku, který nebyl dehydrován. Míru dehydrace vzrostných vrcholů

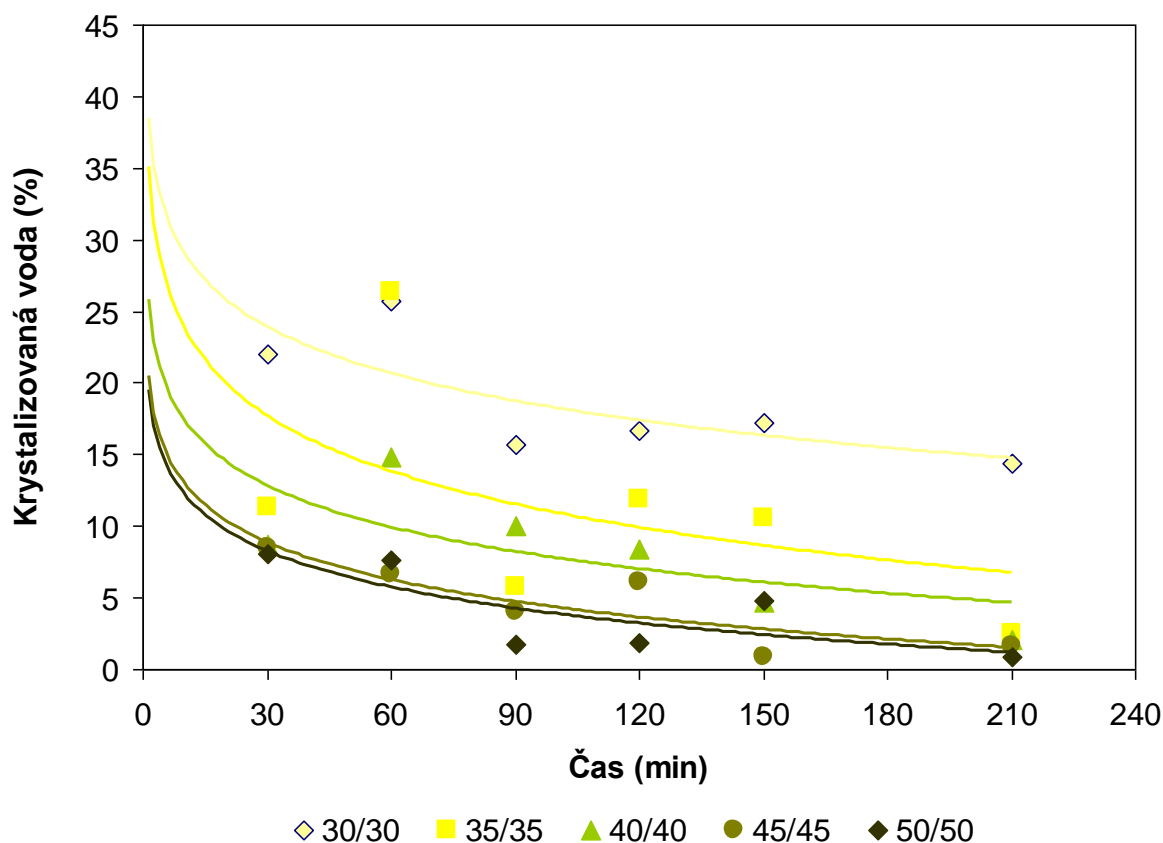
česneku pomocí různých koncentrací kryoprotektivních roztoků znázorňuje obrázek 50. Hodnoty obsahu krystalické vody ve vzrostných vrcholech byly získány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Z hlediska obsahu krystalické vody ve vzrostných vrcholech česneku bylo nejefektivnější působení dehydratace detekováno při použití koncentrace kryoprotektivního roztoku PVS3_x 50/50 % (w/v) sacharóza/glycerol, a to až 1,39 %, což je desetkrát menší koncentrace než u varianty PVS3_x roztoku 30/30 % (w/v) sacharóza/glycerol.



Obrázek 49. Příklad endotermní křivky čerstvého vzrostného vrcholu česneku genotypu Djambul2, měřeno diferenčním skenovacím kalorimetrem DSC TA 2920, hmotnost vzorku 10,060 mg, rychlost chlazení a ohřevu 10 °C/min, chlazení do -55 °C. Graf znázorňuje počáteční teplotu tání – onset -9,86 °C, množství spotřebované energie, množství krystalizované vody (32,78 %) ve vzrostném vrcholu (plocha píku) a maximum píku – bod teploty tání na vrcholu křivky tání -1,51 °C.

Dehydratace rostlin ženšenu na hladinu 7,1 % obsahu vody nesnižuje jejich regeneraci po kryoprezervaci, rostliny s obsahem vody při 22,6 % regenerují na 26 % a při vyšším obsahu vody (41,9 %) byla regenerace nulová (Kim *et al.*, 2008). Vysoký obsah vody způsobil poškození buněčných membrán a jejich semipermeabilitu (Panis *et al.*, 2005). Nejvyšší regenerace dosahovali při 12,5 % obsahu vody, a to 90,5 % (Kim *et al.*, 2005). Nejnižší schopnost odolávat dehydrataci meristematických pletiv a zároveň nejvyšší procento krystalické vody bylo detekováno u česneku s vitrifikačním roztokem 30/30 % (w/v)

sacharóza/glycerol, a to po celou dobu působení (od 30 minut do 150 minut) v porovnání s dalšími sledovanými variantami.



Obrázek 50. Procento krystalické vody ve vzrostných vrcholech česneku genotypu Djambul2 v závislosti na době působení (30–210 min) různě koncentrovaných kryoprotektivních roztoků (30/30; 35/35; 40/40; 45/45; 50/50 (w/v) % sacharóza/glycerol). Naměřenými hodnotami byly proloženy logaritmické křivky s korelačním koeficientem průkazným na hladině $P \leq 0,01$.

S prodlužující se dobou působení PVS3_x roztoků došlo ve všech variantách ke snižování obsahu procenta krystalické vody. Při koncentraci PVS3_x 30/30 % (w/v) sacharóza/glycerol se obsah krystalické vody ve vzrostných vrcholech česneku pouze přiblížil k 15% hranici obsahu krystalické vody. Se zvyšující se koncentrací kryoprotektivních PVS3_x roztoků došlo ke snižování obsahu krystalické vody ve vzrostných vrcholech česneků. Pro zamrazování vzrostných vrcholů česneku se ukázala vhodná koncentrace PVS3_x roztoku 50/50 % (w/v) sacharóza/glycerol ze zkoumaných. Vliv různých časových intervalů při působení vitrifikačního roztoku PVS3 porovnávali pomocí termické analýzy ve své práci Kim *et al.* (2006a). Měrná tepelná energie (entalpie) při chlazení udávala 1,7 J g⁻¹ čerstvé hmoty a

při ohřevu $-2,2 \text{ J g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Regeneraci rostlin potom udávali na 80,4 % při použití vitrifikačního roztoku PVS3 s dobou účinku 120 minut.

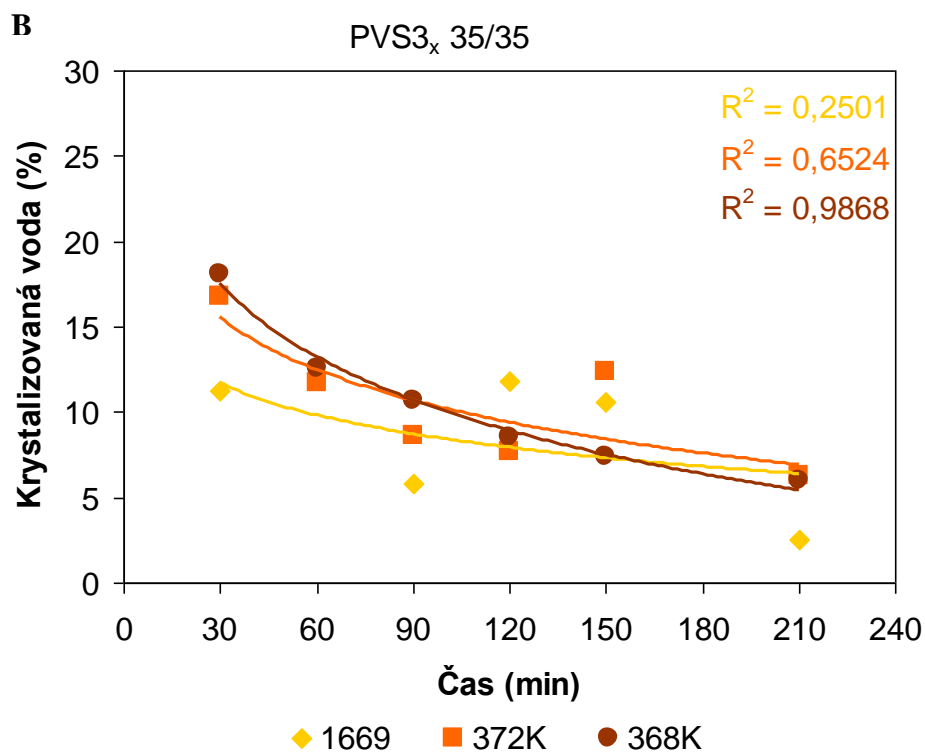
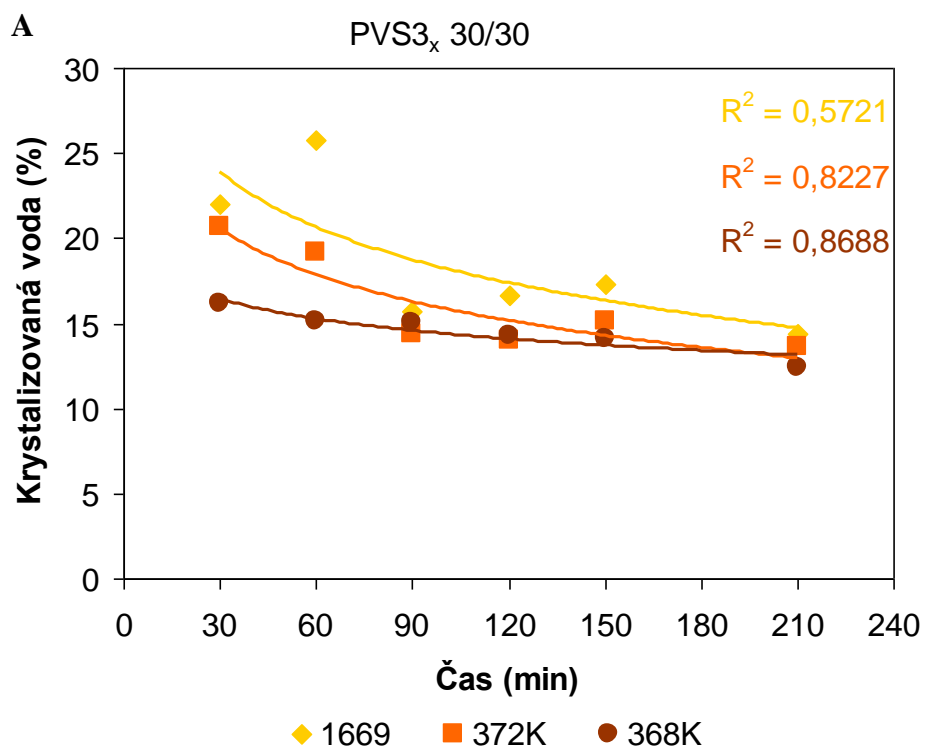
Bylo zjištěno, že účinek kryoprotektivního roztoku PVS3 na množství krystalické vody je závislý na délce působení. Procento krystalické vody (plocha píku) je v tomto případě poměrně vysoké (32,8 %). Tab. 8 uvádí procento krystalické vody v meristemickém pletivu česneku v závislosti na čase pro jednotlivé kryoprotektivní roztoky, kterými byla proložena statistická funkce nelineární korelace (Obr. 51, A-E) a byl vypočten korelační koeficient s R průkazným na hladině $P \leq 0.01$.

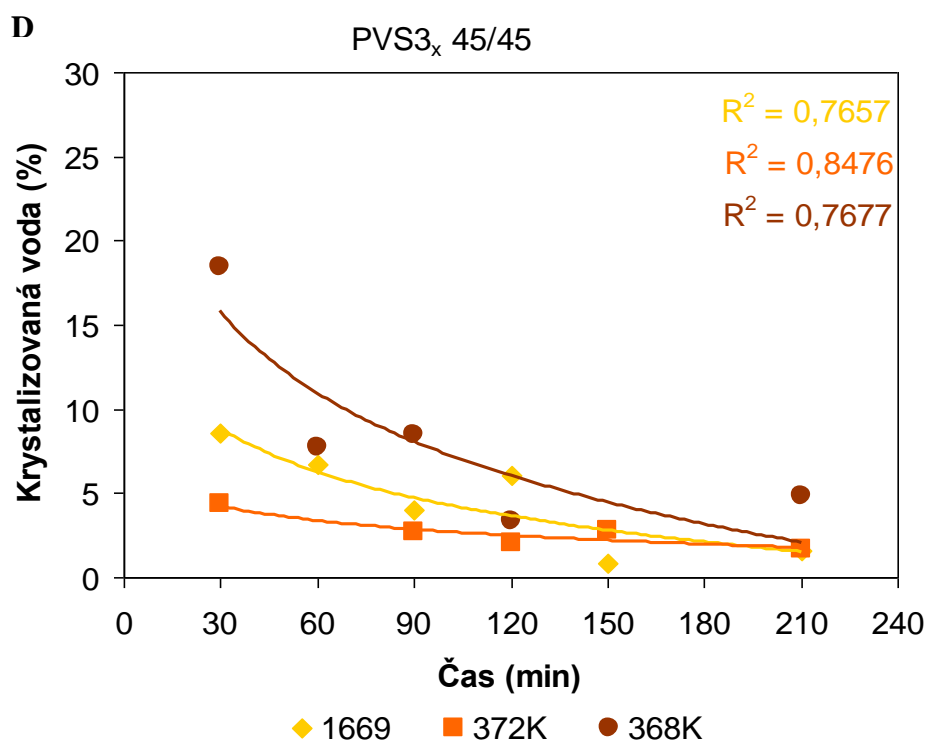
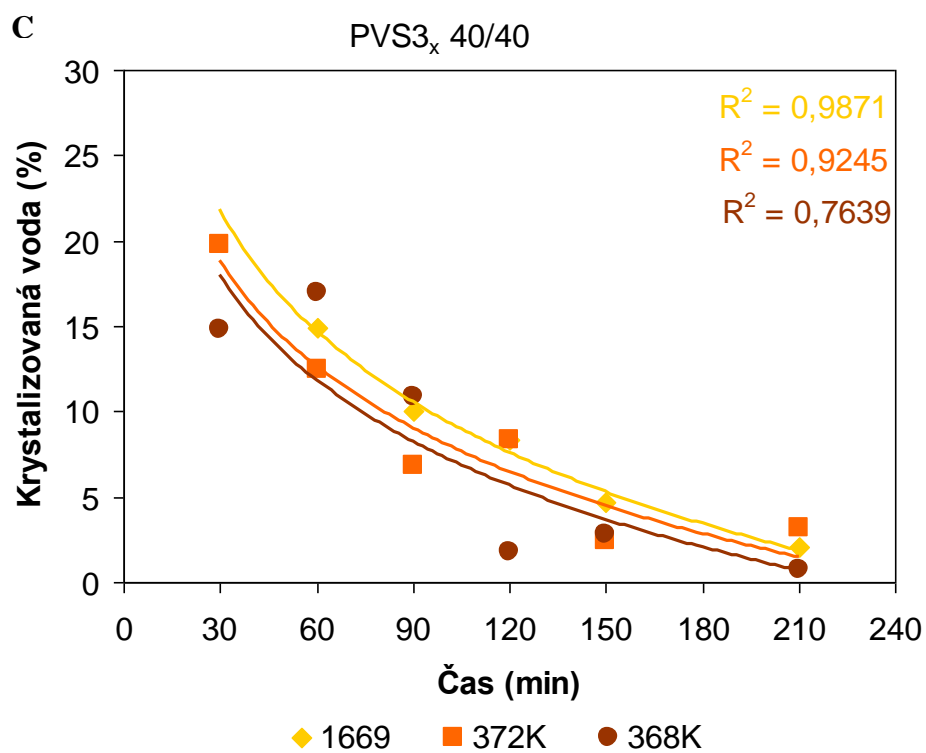
Nejnižší schopnost dehydratace meristemických pletiv a nejvyšší procento krystalické vody byl detekován u PVS3 30/30 (13,89 %) a to po celou dobu působení od 150 minuty v porovnání s dalšími sledovanými variantami. Nejvyšší schopnost dehydratace a nejnižší procento zkrystalizované vody byly u PVS 50/50, a to až 1,4krát méně než u varianty PVS3 30/30, uvedené výsledky korelují s hodnotami pro vitrifikační roztok PVS3 v časovém rozpětí 150–180 min v práci Kim *et al.* (2005).

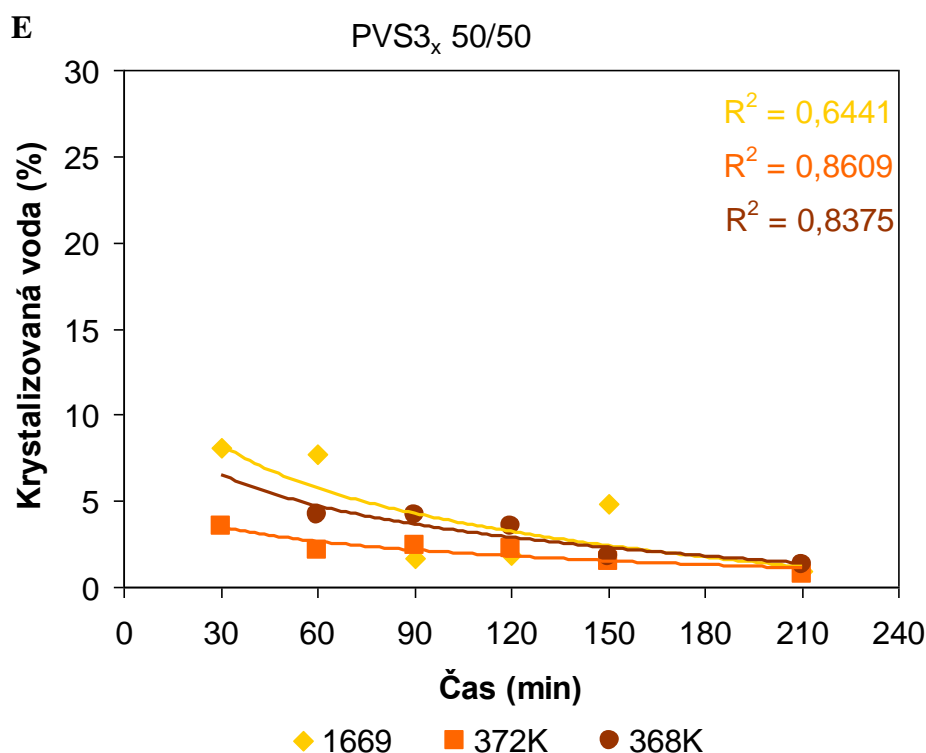
Tabulka 8. Procento krystalické vody v závislosti na čase dehydratace kryoprotektivních roztoků PVS s různou koncentrací sacharózy/glycerolu. Naměřenými hodnotami byly proloženy logaritmické křivky s R průkazným na hladině $P \leq 0.01$.

Ovlivnění	Dehydratace v PVS									Korelační rovnice	R**
	24 hod	20 min	30	60	90	120	150	210			
čerstvé	30,8										
24 h Ci 3	54,5										
20 min LS		38,9									
PVS 30/30			26,9	21,3	17,2	15,6	14,8	13,9		$y = -6,97\text{Ln}(x) + 49,8$	0,980
PVS 35/35			25,7	11,6	11,3	10,4	5,7	2,6		$y = -10,88\text{Ln}(x) + 60,4$	0,955
PVS 40/40			14,9	10,1	9,0	8,3	4,6	2,2		$y = -6,18\text{Ln}(x) + 36,1$	0,973
PVS 45/45			8,7	7,7	6,1	4,1	1,8	1,4		$y = -4,14\text{Ln}(x) + 23,7$	0,956
PVS 50/50			7,8	6,7	4,8	2,0	1,4	1,0		$y = -3,99\text{Ln}(x) + 22,0$	0,960

Pozn. V prvním řádku je hodnota procenta krystalické vody, ve druhém řádku je hodnota po 24 h kultivaci vzrostných vrcholů na kultivačním MS médiu se zvýšeným obsahem sacharózy. Třetí řádek odpovídá 20 min v roztoku LS (z angl. loading solution), následující řádky odpovídají působení různě koncentrovaným kryoprotektivním roztokům.

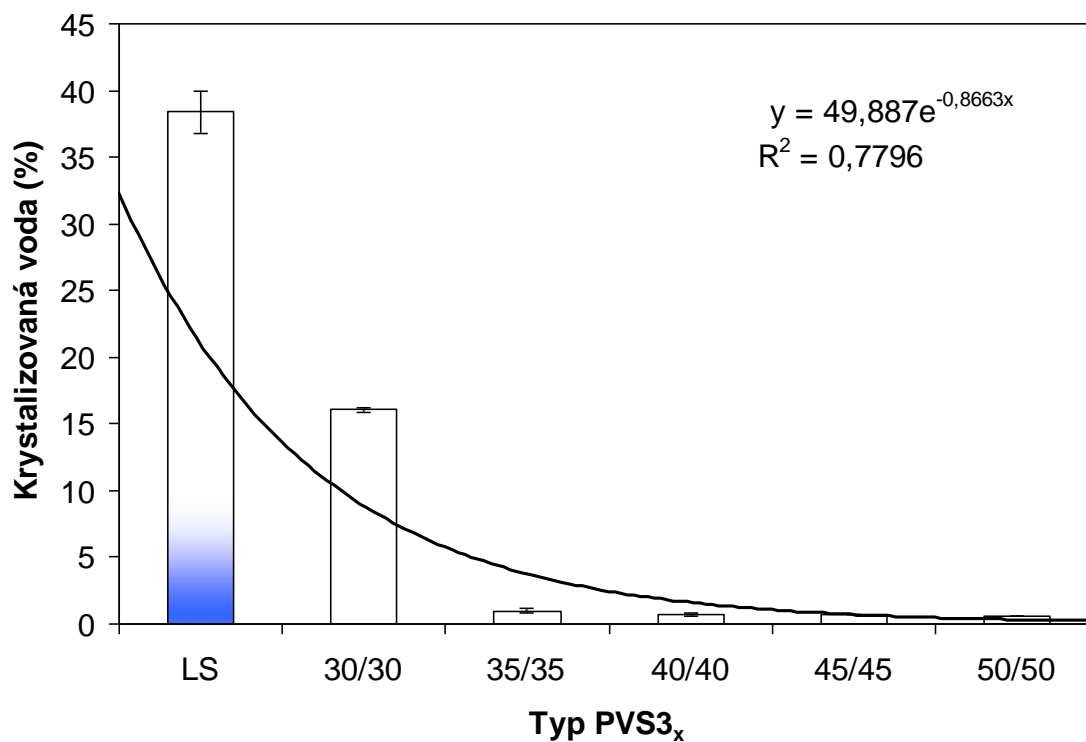




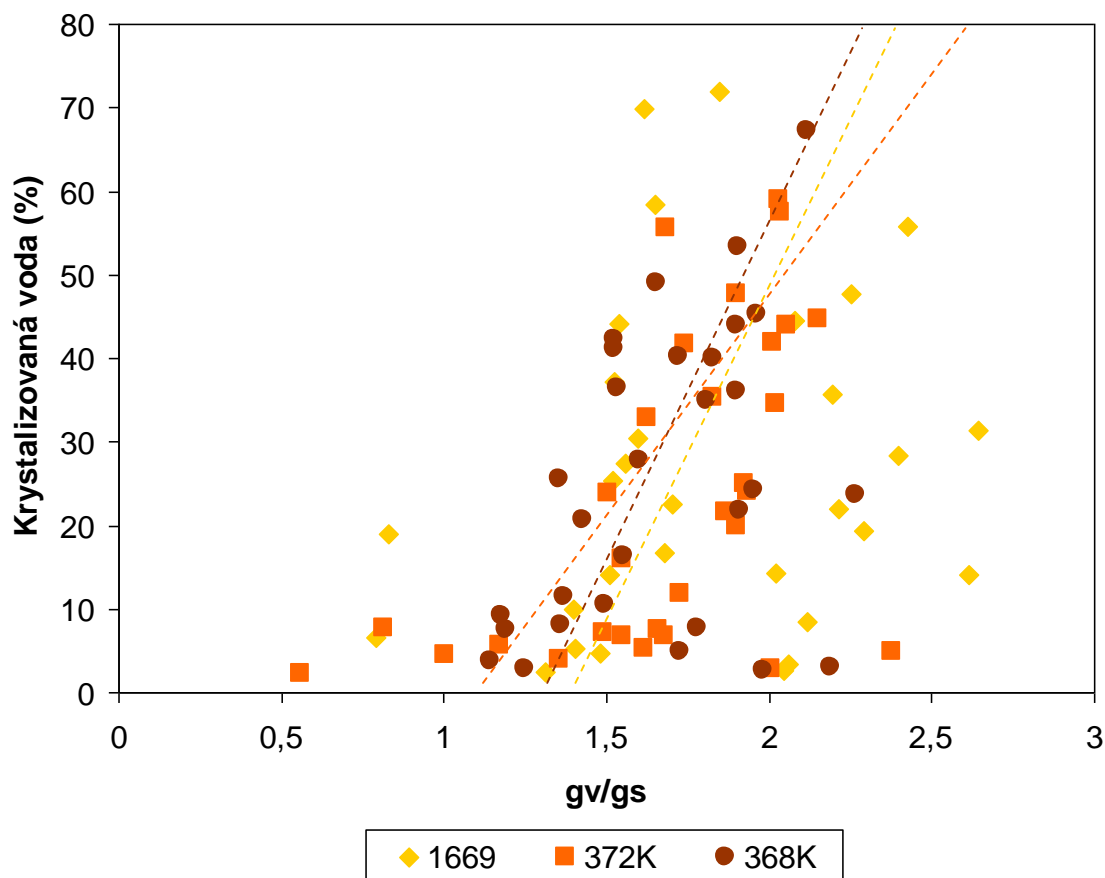


Obrázek 51. Srovnání tří genotypů *Allium sativum* po dehydrataci PVS3_x v časovém rozpětí od 30 do 210 min. Krystalická voda měřená pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) integrací píku vydělené tepelnou kapacitou 333 J g K⁻¹ vztaženo na množství vody. A PVS3 30/30 (w/v) % sacharóza/glycerol; B PVS3 35/35 (w/v) % sacharóza/glycerol; C PVS3 40/40 (w/v) % sacharóza/glycerol; D PVS3 45/45 (w/v) % sacharóza/glycerol; E PVS3 50/50 (w/v) % sacharóza/glycerol.

Obsah krystalické vody v meristematických buňkách vzrostných vrcholů česneku klesá s prodlužující se délkou působení kryoprotektivního roztoku, nejvýraznější snížení obsahu vody nastalo u varianty PVS3 50/50, kdy došlo k překročení hranice 1 gv/gs (Obr. 52) v časovém úseku 90–120 minut. Pod hranici obsahu vody 1,5 gv/gs se dostala PVS3 40/40 po 210 minutách, PVS3 45/45 po 150 minutách a PVS3 50/50 již v rozmezí 60–90 minut. Ukazuje se, že část vitrifikačního roztoku prochází buněčnou membránou a do určité míry nahrazuje vodu. Naměřená data ukazují stejnou závislost jako výsledky uvedené Volk a Walter (2006), kde byla provedena studie termické analýzy na kryoprotektivním roztoku PVS2. Jejich výsledky potvrzují, že etylenglykol a DMSO se dostávají do buněk, kde vytváří biologické sklo, a tím chrání buňky před negativním vlivem nízké teploty a růstem ledových krystalů. Obsah vody se v naší práci snížil na v průměru na 0,7 gv/gs (Obr. 53). Lu a Liu (2004) uvádí, že obsah nemrznoucí vody se nachází v rozmezí 8,2–9,7 %, aktivita vody je závislá na bodě mrznutí a obsah vody je přímo úměrný množství mrznoucí vodě.



Obrázek 52. Krystalizovaná voda meristematických pletiv vzrostných vrcholů česneku v závislosti na koncentraci vitrifikačního roztoku PVS3_x po 120 min působení, první sloupec odpovídá množství krystalizované vody meristematických pletiv rostlin *Allium sativum* v závislosti na roztoku LS po 20 min působení. Směrodatné odchylky jsou počítány ze tří opakování. Naměřenými daty byla proložena exponenciální funkce s výpočtem korelačního koeficientu.



Obrázek 53. Termická analýza obsahu krystalizované vody meristemických pletví tří genotypů *Allium sativum* v závislosti na hmotnosti vody/sušiny. Proložené přímky ukazují hodnoty hranice nemrzoucí vody. 1669 1,4 gv/g; 372K 1,1 gv/g; 368K 1,3 gv/g.

Tabulka 9. Složení PVS_{3x} vitrifikačních roztoků, obsah krystalizované vody v PVS roztocích a teplota na počátku rekrystalizace PVS_{3x} roztoků použitých v této studii

PVS _{3x}	Gly (w/v %)	Sach. (w/v %)	H ₂ O (w/v %)	CKR (w/v %)	Mr (g/mol)	OKV (%)	Onset (°C)
30/30	30	30	57,3	117,3	32,6	90,67	-28,13 ± 2,84
35/35	35	35	50,2	120,2	36,8	67,94	-28,52 ± 4,01
40/40	40	40	43,1	123,1	41,8	73,64	-29,25 ± 2,61
45/45	45	45	35,9	125,9	48,2	74,84	-27,43 ± 3,13
50/50	50	50	28,8	128,8	56,3	56,76	-25,40 ± 1,43

Pozn. PVS_{3x}: Plant Vitrification Solution 3, Gly: glycerol, Sach.: sacharóza, H₂O: obsah vody v roztoku, CKR: celková koncentrace roztoku, Mr: molarita roztoku, OKV: obsah krystalizované vody, Onset: počáteční teplota rekrystalizace vitrifikačního roztoku

Fyzikální vlastnosti vitrifikačního roztoku PVS_{3x} jsou uvedeny v Tab. 9. Rostoucí koncentrace glycerolu a sacharózy (ze 30 w/v % na 50 w/v %) v kryoprotektivním roztoku a

snižující obsah vody (z 57,3 w/v % na 28,8 w/v %) v celkovém množství roztoku vede ke snížení obsahu krystalizované vody ve vitrifikačním roztoku z 90,67 % až na 56,76 %. Molarita roztoku se zvyšující se koncentrací roztoku stoupá, zároveň se zvyšuje viskozita jednotlivých roztoků (Fahy *et al.*, 2004). To může mít významný vliv na rychlost dehydratace rostlinného materiálu. Počátek rekrystalizace vitrifikačních roztoků se v závislosti na koncentraci jednotlivých složek pohybuje v rozmezí $-28,13 \pm 2,84$ °C do $-25,40 \pm 1,43$ °C.

Tepelná kapacita vyjadřuje množství tepla, které je nutné dodat, aby se látka ohřála o 1 °C. Se vzrůstající koncentrací vitrifikačních roztoků PVS_{3x}, dochází k postupnému snižování tepelné kapacity, tzn., že čím je aplikovaný vitrifikační roztok koncentrovanější, tím potřebuje menší množství tepla na ohřátí, tak dochází ke snižování tepelné kapacity. Exoterma při chlazení je menší než endoterma, to způsobuje nižší hodnoty tepelné kapacity. S rostoucí dobou působení kryoprotektivního roztoku na vzrostné vrcholy *Allium sativum* dochází ke snižování tepelné kapacity. Z tabulky (Tab. 9) je patrné, že koncentrace vitrifikačního roztoku PVS3 30/30 je příliš nízká, naproti ostatním roztokům působí méně osmoticky, přesto má tendenci snižovat koncentraci během dehydratace. Z výsledků je patrné, že čím více se blíží tepelná kapacita vitrifikačního roztoku k nule, tím významnější byly jeho vlastnosti z pohledu přežití a regenerace rostlin (Tab. 10). Podobné výsledky předkládají Kim *et al.* (2009) pro různé složení vitrifikačního roztoku PVS2 a PVS3. Z pohledu přežití a regenerace rostlin *Allium sativum* uvádí nejvhodnější složení vitrifikačního roztoku PVS2 glycerol (37,5 w/v %), DMSO (15 w/v %), EG (15 w/v %), sacharóza (22,5 w/v %). Pro vitrifikační roztok bylo nejvhodnější složení PVS3 glycerol (50 w/v %) a sacharóza (50 w/v %). V naší práci bylo dosaženo nejvyšších hodnot přežití 62,7 % a regenerace 62,2 % rostlin po kryoprezervaci.

Tabulka 10. Tepelná kapacita (Cp) vitrifikačních roztoků PVS_{3x} aplikovaných na vzrostné vrcholy rostlin *Allium sativum* během chlazení a ohřevu vzorků v časové závislosti

Čas (min)	Cp (J g ⁻¹), chlazení					Cp (J g ⁻¹), ohřev				
	30/30	35/35	40/40	45/45	50/50	30/30	35/35	40/40	45/45	50/50
30	85,1	66,41	14,51	21,67	14,62	87,57	87,67	30,17	29,1	26,2
60	70,37	25,07	31,22	15,16	18,1	73,28	37,12	49,95	22,3	25,63
90	13,35	10,15	25,02	9,33	2,64	51,53	19,72	33,88	13,62	6,65
120	2,29	21,86	17,41	13,68	2,43	55,99	39,17	27,85	20,25	6,13
150	50,2	21,79	13,33	0,36	11,98	57,65	34,91	15,42	3,48	16,05
210	20,07	2,13	3,37	2,57	0,79	50,25	8,44	7,46	4,65	4,66

Pozn. Předkultivace vzrostných vrcholů *Allium sativum* v různých PVS_{3x} roztocích při teplotě $20 \pm 0,5$ °C v časovém rozpětí od 30 do 210 min, pro měření pomocí DSC byly vzorky před zmrazením hermeticky uzavřeny do hliníkové pánvičky s víčkem

Tabulka 11. Přežití a regenerace (%) nezamrazených kontrolních (LN-) a kryoprezervovaných (LN +) vzrostných vrcholů rostlin *Allium sativum* dehydratovaných různými typy PVS3_x roztoků po dobu 120 min, obsah vody (%) dehydratovaných vzrostných vrcholů pomocí PVS3_x roztoků po 120 min působení vitrifikačního roztoku

PVS3 _x	OV (%) dehydratované vzrostné vrcholy	LN-		LN+	
		Přežití (%)	Regenerace (%)	Přežití (%)	Regenerace (%)
30/30	67,51	90,0± 4,14	75,3±17,77	27,4±10,46	24,6± 8,10
35/35	61,45	86,5±12,46	79,4±15,51	16,1± 3,35	18,6± 8,09
40/40	63,02	81,0±12,49	73,6±16,20	59,7±20,68	44,2±14,64
45/45	62,69	91,0± 8,13	74,8± 6,84	47,9±11,17	45,2±10,31
50/50	44,22	86,0±12,24	95,3± 4,12	62,7±21,69	62,2±26,57

Pozn. PVS3_x kryoprotektivní roztok (z angl. Plant Vitrification Solution 3 a jeho modifikace), OV obsah vody, LN- vzrostné vrcholy bez kryoprezervace, LN+ kryoprezervované vzrostné vrcholy

Přežití a regenerace vzrostných vrcholů *Allium sativum* je uvedeno v Tab. 11. Vzrostné vrcholy *Allium sativum* v kontrolní variantě dosáhly průměrné hodnoty přežití $86,8 \pm 3,5$ % a průměrné hodnoty regenerace $79,7 \pm 8,1$ %. Rostliny po kryoprezervaci měly hodnoty přežití v rozpětí 16,1–62,7 %, regenerace rostlin byla 18,7–62,2 % v závislosti na použité koncentraci kryoprotektivního roztoku. Hodnoty přežití rostlin jsou zpravidla vyšší než u regenerace, v případě přežití se jedná o hodnocení po 2 týdnech od kryoprezervace. V tomto termínu lze ukázat jakou bude mít pravděpodobnost úspěchu použitá metoda kryoprezervace na daný druh rostliny či genotyp. Při hodnocení přežití rostlin se ještě neprojeví všechny druhy poškození, včetně reparačních procesů způsobené, při manipulaci vzorku a jeho kryoprezervaci. Termín regenerace je stanoven na 10. týden od odtání z ultra-nízké teploty (8. týden po hodnocení přežití). Přežití a regenerace rostlin *Allium sativum* po aplikaci koncentrace roztoků PVS3 30/30 a PVS3 35/35 nespĺňují standardní podmínky pro uchování rostlin v kryobance, která udává limit regenerace pro uchování v tekutém dusíku minimálně 30 % (Keller, 2005). Rostliny kryoprezervované pomocí vitrifikačního roztoku PVS3 40/40, PVS3 45/45 a PVS3 50/50 dosahovaly průměrné přežití nad $47 \pm 6,3$ % a regeneraci nad $44 \pm 8,3$ %. Pro úspěšnou kryoprezervaci rostlin *Allium sativum* lze doporučit vitrifikační roztoky s koncentrací nad 40 (w/v) % vzájemného poměru sacharóza/glycerol.

Dílčí cíl optimalizace a koncentrace kryoprotektivních látek pro zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci byl splněn. Byla potvrzena hypotéza o zvýšení regenerace česneku složením a koncentrací kryoprotektivních látek. Termickou analýzou byla potvrzena hypotéza, že je možné optimalizovat složení a koncentraci kryoprotektivních látek pomocí DSC.

6 Závěry a doporučení pro využití poznatků v praxi

Pomocí fyziologických vlastností sledovaných genotypů *Allium sativum* byly charakterizovány vlivy vnějších (teplota při kultivaci, koncentrace sacharózy v médiu, délka otužování za nízkých teplot) a vnitřních (úroveň otužení, délka dormance) podmínek ovlivňujících úroveň regenerace po kryoprezervaci.

- Úpravou vnějších podmínek, koncentrací sacharózy v médiu 15 g l^{-1} a kultivací vzrostných vrcholů *Allium sativum* při teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$, bylo statisticky průkazně dosaženo maximálního růstu rostlin. Po 6 týdenní kultivaci rostlin v *in vitro* podmínkách bylo prokázáno, že dochází k limitaci živinami. Optimální charakteristiky pro růst rostlin *Allium sativum* v *in vitro* podmínkách byly potvrzeny na třech genotypech.

- Hypotéza o pozitivním vlivu kolísavé teploty ($+5/+20 \text{ }^\circ\text{C}$) s frekvencí 24 h a amplitudou $15 \text{ }^\circ\text{C}$ působící na rostliny po dobu 0-16 týdnů se během otužování nepotvrdila. Mrazovými testy bylo prokázáno, že vlivem nízké teploty bylo způsobeno vyšší poškození na úrovni plazmatické membrány ($-13 \text{ }^\circ\text{C}$), zatímco hodnocená úroveň regenerace po 16 týdnech byla zvýšena o $8 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Teplota při skladování pacibulek v rozmezí $+4$ až $+30 \text{ }^\circ\text{C}$ ovlivnila délku dormance. V termínu od sběru (polovina srpna) do poloviny září byla délka dormance konstantní a její délka byla 1 měsíc. Při vyšší teplotě skladování pacibulek došlo ke statisticky významnému prodloužení klidového období a snížení vitality rostlin.

- Růstové charakteristiky v průběhu 6 týdenní kultivace rostlin klesaly, z pohledu hodnot čistého výkonu asimilace se po 5 týdnech přiblížily k $40 \text{ g m}^{-2} \text{ den}^{-1}$, relativní rychlost růstu po 5 týdnech kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách dosáhla 10 % původní hodnoty. Bylo potvrzeno, že hlavním zdrojem uhlíku rostlin v *in vitro* podmínkách není fotosyntéza, ale sacharóza obsažená v kultivačním médiu.

- Optimalizovaly se podmínky pro multiplikaci rostlin, mechanickou stimulací meristematického pletiva podpučí. Nejvyšší multiplikační koeficient po mechanické stimulaci byl 3 rostliny/rostlinu/měsíc. Dále byla použita fytohormonální stimulace meristematického pletiva pomocí rostlinných regulátorů růstu, a to kyselinou α -naftyloctovou (NAA) a 6-benzylaminopurinem (BAP). Bylo zjištěno, že multiplikační maximum existuje ve dvou optimech koncentrace hormonů. Při použití růstových regulátorů $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA a 1 mg l^{-1} BAP byl multiplikační koeficient 12, rovněž stejný multiplikační koeficient byl zjištěn ve druhém případě 3 mg l^{-1} NAA a $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ BAP.

- Byl zjištěn negativní vliv hyperhydratace rostlin *Allium sativum* při multiplikaci a po kryoprezervaci rostlin. Bylo zjištěno, že hyperhydratace byla provázena statisticky významně vysokým obsahem vody, který vedl k letálním změnám u rostlin. Hyperhydratované rostliny nebyly vitální, měly deformované listy, průsvitná pletiva a ztloustlé vitrifikované listy, tím způsobovaly snížení regenerace po kryoprezervaci. Byly kvantifikovány dva základní projevy hyperhydratace – významná ztráta chlorofylu a zvýšený obsah vody. Tímto se přispělo k poznání hyperhydratace, ale základní příčina vzniku hyperhydratace nebyla dosud zjištěna.

- Z pěti zkoušených kryoprotektivních roztoků byla statisticky průkazná kombinace rostlinného vitrifikačního roztoku (PVS3) 50/50 w/v % sacharóza/glycerol nejvhodnější. Na základě měření termických vlastností rostlin byla nalezena optimální kombinace kryoprotektivních látek v roztoku 50/50 w/v % sacharóza/glycerol z hlediska vztahu regenerace po kryoprezervaci.

- Na základě kalorimetrického měření vzorků z rostlin ovlivněných PVS3 50/50 byla optimalizována doba pro působení roztoku PVS3 na 120 min. Po této době působení PVS3 se snížil obsah zmrzlé vody na hodnotu 0,1 %, který vedl ke zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci, kdy byla buňka schopna lépe odolat extracelulárnímu ledu tvořícího se z tak malého obsahu vody, a tím došlo k nízkému úhynu. Tato kombinace kryoprotektivních látek a doba působení byla také potvrzena nejvyšší regenerací (62,2 %) po vystavení rostlin ultra-nízkým teplotám.

- Byl stanoven jeden ze způsobů působení osmotických látek pro zvýšení regenerace rostlin vystavených ultra-nízkým teplotám. Byla to osmotická dehydratace, vedoucí ke ztrátě vody až do letální úrovně, což se shodovalo s teorií poškození rostlin extracelulární tvorbou ledu.

- Exaktní měření termických vlastností rostlin před kryoprezervací pomohlo zvýšit regenerační schopnost po kryoprezervaci, a tím bylo potvrzeno, že termická analýza je vhodným nástrojem nejen pro zjišťování termických charakteristik, ale také optimalizaci působení kryoprotektivních látek. Byla potvrzena hypotéza o zvýšení regenerace rostlin *Allium sativum* po kryoprezervaci, což umožnilo rutinní použití kryoprotektivních roztoků při zavádění rostlin do kryobanky.

6.1 Doporučení pro využití poznatků v praxi

Metody kryoprezervace umožňují dlouhodobé uchování geneticky stabilního rostlinného materiálu při ultra-nízké teplotě, při které dochází k zastavení všech

biochemických reakcí. Vitřifikační roztoky indukují vznik skelného stavu charakterizovaný teplotou skelného přechodu v rostlinném pletivu a tím zamezení tvorby ledových krystalů při mrazení. Zvýšení regenerace rostlin po kryoprezervaci může být ovlivněno pomocí aplikace vhodných kombinací kryoprotektivních látek v kryoprotektivní směsi. Rozvoj nových kryoprotektivních roztoků, snížení toxicity vitřifikačních směsí, snazší a rychlejší penetrace kryoprotektantů do buněk a optimální dehydratace pletiv umožní zvýšit přežití a regeneraci rostlin a rozšíření metod kryoprezervace na další druhy a genotypy vegetativně množených rostlin. Výsledky byly shrnuty v certifikované metodice (Zámečník *et al.*, 2012), která je doporučena pro praktické využití kryokonzervace vegetativně množených rostlin rodu *Allium*.

7 Seznam literatury

- Aazami, M.A., Torabi, M., Shekari, F. 2010. Response of some tomato cultivars to sodium chloride stress under *in vitro* culture condition. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (18), 2589-2592.
- Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in isolated chloroplasts - polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24 (1), 1-15.
- Ayabe, M., Sumi, S. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 17 (10), 773-779.
- Baek, H.J., Kim, H.H., Cho, E.G., Chae, Y.A., Engelmann, F. 2003. Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *Cryo Letters*, 24 (6), 381-388.
- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (1), 23-58.
- Bellich, B., Borgogna, M., Carnio, D., Cesáro, A. 2009. Thermal behavior of water in micro-particles based on alginate gel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 97 (3), 871-878.
- Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27 (3), 141-219.
- Berjak, P., Pammenter, N.W., Vertucci, C. 1992. Homoiohydrous (Recalcitrant) seeds - developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia-Kirkii* Dyer. *Planta*, 186 (2), 249-261.
- Bhandari, B.R., Roos, Y.H. 2003. Dissolution of sucrose crystals in the anhydrous sorbitol melt. *Carbohydrate Research*, 338 (4), 361-367.
- Boettcher, I., Zoglauer, K., Goering, H. 1988. Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro* (*Dianthus chinensis*, glassiness). *Physiologia Plantarum*, 72 (3), 560-564.
- Boltenkov, E.V., Zarembo, E.V. 2005. *In vitro* regeneration and callogenesis in tissue culture of floral organs of the genus *Iris* (Iridaceae). *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk - Seriya Biologicheskaya*, (2), 174-179.
- Bryant, G., Koster, K.L., Wolfe, J. 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research*, 11, 17-25.
- Caillot, S., Rosiau, E., Laplace, C., Thomasset, B. 2009. Influence of light intensity and selection scheme on regeneration time of transgenic flax plants. *Plant Cell Reports*, 28 (3), 359-371.
- Callister, A.N., Arndt, S.K., Adams, M.A. 2006. Comparison of four methods for measuring osmotic potential of tree leaves. *Physiologia Plantarum*, 127 (3), 383-392.

- Cantwell, M.I., Kang, J., Hong, G. 2003. Heat treatments control sprouting and rooting of garlic cloves. *Postharvest Biology and Technology*, 30 (1), 57-65.
- Carpentier, L., Desprez, S., Descamps, M. 2003. Crystallization and glass properties of pentitols - Xylitol, adonitol, arabitols. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 73 (2), 577-586.
- Carpentier, S.C., Coemans, B., Podevin, N., Laukens, K., Witters, E., Matsumura, H., Terauchi, R., Swennen, R., Panis, B. 2008. Functional genomics in a non-model crop: transcriptomics or proteomics? *Physiologia Plantarum*, 133 (2), 117-130.
- Castillo, N.R.F., Bassil, N.V., Wada, S., Reed, B.M. 2010. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46 (3), 246-256.
- Cattabiani, A., Bartošová, D., Štaralová, E. 2006. Florarium: mýty, legendy a symboly spjaté s květinami a rostlinami. *Volvox Globator*. 783s. ISBN: 9788072075959.
- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N., Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 360 (1462), 1889-1895.
- Chung, K.H., Nam, S.I. 2001. Method for producing microbulbs of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. United States Patent 6265217, 09/516070.
- Condello, E., Palombi, M.A., Tonelli, M.G., Damiano, C., Caboni, E. 2009. Genetic stability of wild pear (*Pyrus pyraeaster*, Burgsd) after cryopreservation by encapsulation dehydration. *Agricultural and Food Science*, 18 (2), 136-143.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. 1987. *Molecular cell biology*, by James Darnell, Harvey Lodish and David Baltimore; Scientific American Books, W. H. Freeman & Co., New York, NY. Gamete Research, 17 (1), 95.
- Ding, F., Jin, S., Hong, N., Zhong, Y., Cao, Q., Yi, G., Wang, G. 2008. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. *Plant Cell Reports*, 27 (2), 241-250.
- Dotlačil, L., Štolc, K.J. 1998. National Programme on Plant Genetic Resources Conservation and Utilization in the Czech Republic. Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Czech Board on Plant Genetic Resources, Research Institute of Crop Production, Praha – Ruzyně. Genetické zdroje č. 71 (Plant Genetic Resources no. 71) VÚRV Praha, 64s. ISBN: 8023832077.
- Dumet, D., Grapin, A., Bailly, C., Dorion, N. 2002. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems. *Plant Science*, 163 (6), 1121-1127.
- Dyduch, J., Najda, A. 2001. Estimation of the biological value of winter garlic leaves from early cultivation on bunch crop. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU)*, 4 (2), 48-53.

- Ebertz, S.L., McGann, L.E. 2004. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology*, 49 (2), 169-180.
- El-Gizawy, A.M., Ford-Lloyd, B.V. 1987. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9 (2), 147-150.
- Ellis, D., Skogerboe, D., Andre, C., Hellier, B., Volk, G. 2006. Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *Cryo Letters*, 27 (2), 99-106.
- Elmoazzen, H.Y., Elliott, J.A., McGann, L.E. 2002. The effect of temperature on membrane hydraulic conductivity. *Cryobiology*, 45 (1), 68-79.
- Engelman, F. 2009. Biotechnologies and conservation of phylogenetic resources. *Cahiers Agricultures*, 18 (6), 481-485.
- Evans, G. C. 1972. The quantitative analysis of plant growth. University of California Press. 734s. ISBN: 9780520094321.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21 (4), 407-426.
- Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., Phan, J., Rasch, C., Chang, A., Zendejas, E. 2004. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*, 48 (2), 157-178.
- Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Triaire, D., Arnault, I., Auger, J., Kahane, R. 2005. Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. *Plant Cell Reports*, 24 (6), 319-325.
- Forsline, P.L., Towill, L.E., Waddell, J.D., Stushnoff, C., Lamboy, W.F., McFerson J.R., 1998. Recovery and longevity of cryopreservation dormant apple buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123 (3), 365-370.
- Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. 2004. *Life in the Frozen State*. Taylor & Francis. 704s. ISBN: 9780415247009.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50 (1), 151-158.
- Getz, H.P., Klein, M. 1995. Characteristics of sucrose transport and sucrose-induced H⁺ transport on the tonoplast of red beet (*Beta vulgaris* L.) Storage Tissue. *Plant Physiology*, 107 (2), 459-467.
- Goldner, E.M., Seitz, U., Reinhard, E. 1991. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cultures: Preculture and freeze tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24 (1), 19-24.
- Gonzalez-Arno, M., Lazaro-Vallejo, C., Engelmann, F., Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y., Pastelin-Solano, M., az-Ramos, C. 2009. Multiplication and

- cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia*). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45 (5), 574-582.
- González-Benito, M.E., Clavero-Ramírez, I., López-Aranda, J.M. 2004. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3), 341-351.
- Gonzalez-Benito, M.E., Mendoza-Condori, V.H., Molina-Garcia, A.D. 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot apices of *Oxalis tuberosa* Mol. *Cryo Letters*, 28 (1), 23-32.
- Grout, B.W.W. 1995. Genetic preservation of plant cells *in vitro*. Springer. ISBN: 9783540574811.
- Halmagyi, A., Deliu, C., Coste, A. 2005. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *Cryo Letters*, 26 (5), 313-322.
- Halmagyi, A., Pinker, I. 2006. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84 (2), 145-153.
- Halmagyi, A., Valimareanu, S., Coste, A., Deliu, C., Isac, V. 2010. Cryopreservation of *Malus* shoot tips and subsequent plant regeneration. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (1), 79-85.
- Haque, M.S., Wada, T., Hattori, K. 1998. Novel method of rapid micropropagation using cyclic bulblet formation from root tip explants in garlic. *Breeding Science*, 48 (3), 293-299.
- Harris, J.C., Plummer, S., Turner, M.P., Lloyd, D. 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology*, 146 Pt 12, 3119-3127.
- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S., Sakai, A. 1998. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, 101 (1), 109-115.
- Hosoki, T., Yasufuku, T. 1992. *In vitro* mass-propagation of chinese artichoke (*Stachys sieboldii* MIQ.). *Acta Horticulturae (ISHS)*, 319, 149-152.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46 (3), 205-229.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B., Askew, A. P. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany*, 90, 485-488.
- Hunt, R., Nicholls, A.O. 1986. Stress and the coarse control of growth and root-shoot partitioning in *Herbaceous* plants. *Oikos*, 47 (2), 149-158.
- Ikeda, T., Fujime, Y., Terabayashi, S., Date, S., 2002. Water status of garlic cyklus under various salt and osmotic stress conditions. *Horticulture Science*, 37 (2), 404-405.

- James, C., Seignemartin, V., James, S.J. 2009. The freezing and supercooling of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration-Revue Internationale du Froid*, 32 (2), 253-260.
- Janáček, J., Prášil, I. 1991. Quantification of plant frost injury by nonlinear fitting of an S-shaped function. *Cryo-Letters*, 12 (1), 47-52.
- Jaya, S., Das, H. 2009. Glass transition and sticky point temperatures and stability/mobility diagram of fruit powders. *Food and Bioprocess Technology*, 2 (1), 89-95.
- Jonnalagadda, S., Robinson, D.H. 2004. Effect of thickness and PEG addition on the hydrolytic degradation of PLLA. *Journal of Biomaterials Science, Polymer edition*, 15 (10), 1317-1326.
- Kajimura, Y., Sugiura, T., Suenaga, K., Itakura, Y., Etoh, T. 2000. A new garlic growing system from bulbils through transplanting. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75 (2), 176-180.
- Kaldenhoff, R., Ribas-Carbo, M., Flexas, J., Lovisolo, C., Heckwolf, M., Uehlein, N. 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell and Environment*, 31 (5), 658-666.
- Kamenetsky, R. 1994. Life-cycle, flower initiation, and propagation of the desert geophyte *Allium-Rothii*. *International Journal of Plant Sciences*, 155 (5), 597-605.
- Kamenetsky, R., Rabinowitch, H.D. 2001. Floral development in bolting garlic. *Sexual Plant Reproduction*, 13 (4), 235-241.
- Kamenetsky, R., Shafir, I.L., Zemah, H., Barzilay, A., Rabinowitch, H.D. 2004. Environmental control of garlic growth and florogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129 (2), 144-151.
- Kami, D., Shi, L., Sato, T., Suzuki, T., Oosawa, K. 2009. Cryopreservation of shoot apices of hawthorn *in vitro* cultures originating from East Asia. *Scientia Horticulturae*, 120 (1), 84-88.
- Kanaze, F.I., Kokkalou, E., Niopas, I., Georgarakis, M., Stergiou, A., Bikiaris, D. 2006. Thermal analysis study of flavonoid solid dispersions having enhanced solubility. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 83 (2), 283-290.
- Kartha, K.K., Leung, N.L. 1979. Cryopreservation of plant meristems as a means of germ plasm storage. *Cryobiology*, 16 (6), 582-583.
- Katkov, I.I. 2002. The point of maximum cell water volume excursion in case of presence of an impermeable solute. *Cryobiology*, 44 (3), 193-203.
- Keller, E.R. 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *Cryo Letters*, 26 (6), 357-366.
- Keller, E.R.J., Senula, A., Leunufna, S., Grube, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration-Revue Internationale du Froid*, 29 (3), 411-417.

- Kim, E.K., Hahn, E.J., Murthy, H.N., Paek, K.Y. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73 (3), 231-236.
- Kim, H.H., Cho, E.G., Baek, H.J., Kim, C.Y., Joachim Keller, E.R., Engelmann, F. 2004a. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *Cryo Letters*, 25 (1), 59-70.
- Kim, H.H., Cho, E.G., Park, S.U. 2006a. Analysis of factors affecting the cryopreservation of garlic shoot tips. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2 (2), 129-132.
- Kim, H.H., Kim, J.B., Baek, H.J., Cho, E.G., Chae, Y.A., Engelmann, F. 2004b. Evolution of DMSO concentration in garlic shoot tips during a vitrification procedure. *Cryo Letters*, 25 (2), 90-100.
- Kim, H.H., Lee, J.H., Shin, D.J., Ko, H.C., Hwang, H.S., Kim, T., Cho, E.G., Engelmann, F. 2008. Desiccation Sensitivity and Cryopreservation of Korean Ginseng Seeds. *Cryoletters*, 29 (5), 419-426.
- Kim, H.H., Lee, J.K., Hwang, H.S., Engelmann, F. 2007. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. *Cryoletters*, 28 (6), 471-482.
- Kim, H.H., Lee, J.K., Yoon, J.W., Ji, J.J., Nam, S.S., Hwang, H.S., Cho, E.G., Engelmann, F. 2006b. Cryopreservation of garlic bulbil primordia by the droplet-vitrification procedure. *Cryoletters*, 27 (3), 143-153.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Park, S.U., Lee, S.C., Baek, H.J., Cho, E.G., Engelmann, F. 2009. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30 (4), 291-299.
- Kim, H.H., Yoon, J.W., Kim, J.B., Engelmann, F., Cho, E.G. 2005. Thermal analysis of garlic shoot tips during a vitrification procedure. *Cryoletters*, 26 (1), 33-44.
- Kobayashi, T., Niino, T., Kobayashi, M. 2005. Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures. *Plant Biotechnology*, 22 (2), 105-112.
- Kodíček, M. 2004. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, VŠCHT Praha. ISBN: 9788070806692.
- Konvička, O., Würfel, P. 1998. *Česnek (Allium sativum L.): základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky*. Vl. nákl. 167s. ISBN: 8023819283.
- Kotková, R., Zámečník, Z., Hejnák, V. 2012a. Zvýšení multiplikačního koeficientu česneku pomocí mechanické stimulace a rostlinných regulátorů. *Zahradnictví 10*, v tisku.
- Kotková, R., Zámečník, J., Faltus, M., Hejnák, V. 2012b. Growth characteristics of garlic in *in vitro* conditions. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 43(3), 85-90.

- Krahulec, F., Duchoslav, M. (2010). 180. Alliaceae J. AGARDH – česnekovitě. - In: Štěpánková J. (ed), Květena České republiky [Flora of the Czech Republic], vol. 8, p. 647-677.
- Kubota, C., Kozai, T. 1992. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. HortScience, 27 (12), 1312-1314.
- Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O., Shaw, J.M. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology, 38 (2), 119-130.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L. 2008. Plant physiological ecology. Springer. 610s. ISBN: 9780387783406.
- Lang, I., Barton, D.A., Overall, R.L. 2004. Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells. Protoplasma, 224 (3-4), 231-243.
- Lang-Pauluzzi, I. 2000. The behaviour of the plasma membrane during plasmolysis: a study by UV microscopy. Journal of microscopy, 198 (Pt 3), 188-198.
- Langis, R., Steponkus, P.L. 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. Plant Physiology, 92 (3), 666-671.
- Le Guen-Le Saos, F., Hourmant, A., Esnault, F., Chauvin, J.E. 2002. *In vitro* bulb development in shallot (*Allium cepa* L. *aggregatum* group): Effects of anti-gibberellins, sucrose and light. Annals of Botany, 89 (4), 419-425.
- Liu, H., Yu, W., Dai, J., Gong, Q., Yang, K., Lu, X. 2004a. Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification. Plant Science, 166 (1), 97-102.
- Liu, Y., Wang, X., Liu, L. 2004b. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification. Plant Science, 166 (3), 677-685.
- Lu, Z.P., Liu, C.T. 2004. A new approach to understanding and measuring glass formation in bulk amorphous materials. Intermetallics, 12 (10-11), 1035-1043.
- Luciani, G.F., Marinangeli, P.A., Curvetto, N.R. 2001. Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. Scientia Horticulturae, 87 (1-2), 11-20.
- Luyet, B.J. 1937. Differential staining for Libiny and dead cells. Science, 85 (2195), 106.
- Makowska, Z., Keller, J., Engelmann, F. 1999. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. Cryo-Letters, 20 (3), 175-182.
- Mansour, M.M.F. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. Plant Physiology and Biochemistry, 36 (10), 767-772.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K., Sakai, A. 1997. Germplasm conservation of *Guazuma crinita*, a useful tree in the Peru-Amazon, by the cryopreservation of *in vitro* cultured multiple bud clusters. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48 (3), 161-165.

- Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H., Sakai, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports*, 20 (5), 398-402.
- Mishima, O., Stanley, H.E. 1998. The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature*, 396 (6709), 329-335.
- Mohamed-Yasseen, Y., Splittstoesser, W.E., Litz, R.E. 1994. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36 (2), 243-247.
- Mukhopadhyay, M.J., Sengupta, P., Mukhopadhyay, S., Sen, S. 2005. *In vitro* stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture. *Scientia Horticulturae*, 104 (1), 1-9.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Murthy, S.S.N., Singh, G. 2008. Examination of the concentration dependence of binary aqueous solutions. *Thermochimica Acta*, 469 (12), 116-119.
- Myers, J.M., Simon, P.W. 1999. Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. *Plant Cell Reports*, 19 (1), 32-36.
- Navarro, A., Banon, S., Olmos, E., Sanchez-Blanco, M.J. 2007. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultra-structure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science*, 172 (3), 473-480.
- Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H., Nojiri, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28 (3), 261-266.
- Niino, T., Tanaka, D., Tantely, R., Fukui, K., Shirata, K. 2007. Cryopreservation of basal stem buds of *in vitro*-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification. *Cryo Letters*, 28 (3), 197-206.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91 (1), 67-73.
- Novák, F.J. 1990. Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia. 208s. ISBN: 8020003444.
- Olmos, E., Piqueras, A., Martinez-Solano, J.R., Hellin, E. 1997. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. *Plant Science*, 130 (1), 97-105.
- Ovesná, J., Kučera, L., Králová, J., Leišová, L., Stavělíková, H., Velišek, J. 2007. Genetic diversity among garlic clones as revealed by Aflp, phenotypic descriptors and S-amino acids level. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 66 (-1), 105-116.

- Ozturk, L., Demir, Y. 2002. In vivo and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation*, 38 (3), 259-264.
- Pak, C., Vanderplas, L.H.W., Deboer, A.D. 1995. Importance of dormancy and sink strength in sprouting of onions (*Allium cepa*) during storage. *Physiologia Plantarum*, 94 (2), 277-283.
- Palta, J.P. 1989. Plasma membrane ATPase as a key site of perturbation in response to freeze-thaw stress. *Current topics in plant biochemistry and physiology*, 8, 41-68.
- Palta, J.P., Leestadelmann, O.Y. 1983. Vacuolated plant cells as ideal osmometer - reversibility and limits of plasmolysis, and estimation of protoplasm volume in control and water-stress-tolerant cells. *Plant Cell and Environment*, 6 (8), 601-610.
- Panis, B., Piette, B., Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*, 168 (1), 45-55.
- Perry, P.L., Ueno, K., Shetty, K. 1999. Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove *Pseudomonas* in unhyperhydrated oregano tissue cultures. *Process Biochemistry*, 34 (6-7), 717-723.
- Plieth, C. 1999. Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors--a model. *Journal of Membrane Biology*, 172 (2), 121-127.
- Prášilová, P., Prášil, I. 2008. Hodnocení mrazuvzdornosti obilnin pomocí mrazového testu a letální teploty. *Metodika*, 1-12.
- Prychid, C.J., Jabaily, R.S., Rudall, P.J. 2008. Cellular ultra-structure and crystal development in *Amorphophallus* (*Araceae*). *Annals of Botany*, 101 (7), 983-995.
- Pyne, A., Surana, R., Suryanarayanan, R. 2002. Crystallization of mannitol below Tg' during freeze-drying in binary and ternary aqueous systems. *Pharmaceutical Research*, 19 (6), 901-908.
- Roksana, M.F.Alam, R.Islam, M.M.Hossain 2002. *In vitro* bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Tissue Culture*, 12 (1), 11-17.
- Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24 (5), 387-402.
- Rall, W.F., Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313 (6003), 573-575.
- Ramiah, V., 1970. Thermogravimetric and differential thermal analysis of cellulose, hemicellulose and lignin. *Journal of Applied Polymer Science*, 14, 1323-1337.
- Rascio, N., La Rocca, N. 2005. Resurrection plants: The puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (3), 209-225.
- Ray, A., Bhattacharya, S. 2008. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rauwolfia serpentina* by PVS2 vitrification. *Cryo Letters*, 29 (4), 321-328.

- Reed, B.M. 2008. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer. 513s. ISBN: 0387722769.
- Richards, F.J. 1959. A flexible growth function for empirical use. Journal of Experimental Botany, 10 (29), 290-300.
- Rohrer, M., Cieslarová, J., Hanáček, P., Vyhnánek, T., Stavělíková, H., 2008. Využití mikrosatelitních markerů pro identifikaci duplicit v kolekci genových zdrojů papriky (*Capsicum* L.). MendelNet'08 Agro, MZLU, Brno, 12, 566-572. ISBN: 9788073752392.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18 (2), 91-120.
- Ryynanen, L., Aronen, T. 2005. Vitrification, a complementary cryopreservation method for *Betula pendula* Roth. Cryobiology, 51 (2), 208-219.
- Sablani, S.S., Syamaladevi, R.M., Swanson, B.G. 2010. A review of methods, data and applications of state diagrams of food systems. Food Engineering Reviews, 2 (3), 168-203.
- Sakai, A. 1965. Survival of Plant Tissue at Super-Low Temperatures .3. Relation Between Effective Prefreezing Temperatures and Degree of Frost Hardiness. Plant Physiology, 40 (5), 882-889.
- Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Japan's International Research Center for Agricultural Science. Proceedings of an international workshop, Tsukuba, Japan, October, 1998., 1-7.
- Sakai, A., Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. Cryoletters, 28 (3), 151-172.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. Plant Science, 74 (2), 243-248.
- Sakai, A., Otsuka, K., Yoshida, S. 1968. Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. Cryobiology, 4 (4), 165-&.
- Salaj, T., Matusikov, I., Panis, B., Swennen, R., Salaj, J. 2010. Recovery and characterisation of hybrid firs (*Abies alba* x *A. cephalonica*, *Abies alba* x *A. numidica*) embryogenic tissues after cryopreservation. Cryo Letters, 31 (3), 206-217.
- Salama, K.H.A. 2009. Amelioration of NaCl-induced alterations on the plasma membrane of *Allium cepa* L. by ascorbic acid. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3 (2), 990-994.
- Santarius, K.A. 1990. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VI. The effect of pH. Cryobiology, 27 (5), 547-561.
- Santarius, K.A., Franks, F. 1998. Cryopreservation of lactate dehydrogenase: Interactions among various cryoprotectants. Cryo-Letters, 19 (1), 37-48.

- Schafer-Menuhr, A., Muller, E., Mix-Wagner, G. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Research*, 39 (4), 507-513.
- Schiller, P., Heilmeier, H., Hartung, W. 1997. Abscisic acid (ABA) relations in the aquatic resurrection plant *Chamaejasme intrepidus* under naturally fluctuating environmental conditions. *New Phytologist*, 136 (4), 603-611.
- Shock, C.C., Feibert, E.B.G., Saunders, L.D. 1998. Onion yield and quality affected by soil water potential as irrigation threshold. *HortScience*, 33 (7), 1188-1191.
- Simperler, A., Kornherr, A., Chopra, R., Bonnet, P.A., Jones, W., Motherwell, W.D., Zifferer, G. 2006. Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: an experimental and in silico study. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110 (39), 19678-19684.
- Sorai, M., Gakkai, N.N., 2004. Comprehensive handbook of calorimetry and thermal analysis. *Journal of Wiley, University of Virginia*, 534s. ISBN: 9780470851524.
- Stajner, D., Varga, I.S. 2003. An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (1-4), 103-106.
- Steponkus, P.L., Lanphear, F.O. 1967. Refinement of triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology*, 42 (10), 1423-1429.
- Sugawara, Y., Takeuchi, M. 1997. A simple and rapid method for determining cell survival in the cryopreserved shoot apex using luciferin-luciferase ATP assay. *Plant Science*, 130 (1), 107-112.
- Suzuki, M., Tandon, P., Ishikawa, M., Toyomasu, T. 2008. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. *Plant Biotechnology Reports*, 2 (2), 123-131.
- Šesták, J. 1984. Thermophysical properties of solids: their measurements and theoretical thermal analysis. Elsevier. 440s. ISBN: 9780444996534.
- Šesták, Z., Čatský, J. 1966. *Metody studia fotosyntetické produkce rostlin*. Academia, nakl. Československé Akademie Věd. 394s.
- Talja, R.A., Roos, Y.H. 2001. Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. *Thermochimica Acta*, 380 (2), 109-121.
- Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K., Hikage, T., Uemura, M. 2004. Cryopreservation of shoot apices of in-vitro grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *Cryo Letters*, 25 (3), 167-176.
- Tang, B., Zhang, L., Zhang, L.L. 2004. Study and application of flow injection spectrofluorimetry with a fluorescent probe of 2-(2-pyridil)-benzothiazoline for superoxide anion radicals. *Analytical Biochemistry*, 326 (2), 176-182.
- Tao, D.L., Li, P.H. 1986. Classification of plant-cell cryoprotectants. *Journal of Theoretical Biology*, 123 (3), 305-310.

- Towill, L.E. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9 (4), 178-180.
- Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 9 (6), 328-331.
- Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M., Takahashi, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*, 8 (7), 418-421.
- Volk, G.M., Caspersen, A.M. 2007. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha X piperita*. *Protoplasma*, 231 (3-4), 215-226.
- Volk, G.M., Harris, J.L., Rotindo, K.E. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52 (2), 305-308.
- Volk, G.M., Henk, A.D., Richards, C.M. 2004a. Genetic diversity among US garlic clones as detected using AFLP methods. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129 (4), 559-569.
- Volk, G.M., Maness, N., Rotindo, K. 2004b. Cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.) using plant vitrification solution 2. *Cryo Letters*, 25 (3), 219-226.
- Volk, G.M., Walters, C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52 (1), 48-61.
- Volk, G.M., Bonnart, R., Waddell, J., Widrechner, M.P., 2009. Cryopreservation of dormant buds from diverse *Fraxinus* species. *CryoLetters* 30 (3), 262-267.
- Von Fircks, H.A., Verwijst, T. 1993. Plant viability as a function of temperature stress (The Richards function applied to data from freezing tests of growing shoots). *Plant Physiology*, 103 (1), 125-130.
- Warnock, D.F., Randle, W.M., Lindstrom, O.M. 1993. Photoperiod, temperature, and plant-age interact to affect short-day onion cold-hardiness. *Hortscience*, 28 (11), 1092-1094.
- Weber, E. 1928. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Gattung *Allium*. Akad. Verlagsges. 44s.
- Wolfe, J., Bryant, G. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration-Revue Internationale du Froid*, 24 (5), 438-450.
- Wu, Z., Chen, L., Long, Y. 2009. Analysis of ultra-structure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45 (4), 483-490.
- Wunderlich, B. 2006. The contributions of MDSC to the understanding of the thermodynamics of polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 85 (1), 179-187.
- Xu, Z., Um, Y.C., Kim, C.H., Lu, G., Guo, D.P., Liu, H.L., Bah, A.A., Mao, A.N. 2008. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from

- the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30 (4), 521-528.
- Zámečník, J., Faltus, M., Kotková, R., 2009. Glass transition determination in *Allium* shoot tips after dehydration. *Fundamentals Aspects of Cryopreservation and Cryoprotection. 1st International Symposium Cryopreservation in Horticultural Species. Acta Horticulturae (ISHS)*, 908, 33-38.
- Zámečník, J., Grospietsch, M., Kotková, R., Faltus, M., 2012. Konzervace genetických zdrojů *Allium* pomocí kryoprezervace. *Metodika hodnocení výsledků výzkumu a vývoje, Mze ČR, Čj.: 17109/2012-MZE*.
- Zhao, Y., Chen, S., Wu, Y., Chang, Y., Zhang, D. 1995. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of apple by vitrification. In: *China Association for Science and Technology Second Academic Annual Meeting of Youths Proceedings (Horticultural Sciences)*. Beijing Agricultural University Press, Beijing, 406– 409.
- Ziv, M., Lilien-Kipnis, H. 2000. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 19 (9), 845-850.
- Zmeškal, O., Sedlak, O., Nežádal, M. 2002. *Metody obrazové analýzy dat. Digital Imaging in Biology and Medicině*. Czech Academy of Science, České Budějovice, 34s. ISBN: 8090125085.
- Zondervan, R., Kulzer, F., Berkhout, G.C., Orrit, M. 2007. Local viscosity of supercooled glycerol near T_g probed by rotational diffusion of ensembles and single dye molecules. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (31), 12628-12633.
- Ostatní zdroje:
- Anonymus, 2003. Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství. Ministerstvo zemědělství, Praha 1, Těšnov 17. Zákon č. 148/2003 Sb.
- Anonymus, 2007. EVIGEZ. Evidence genových zdrojů v ČR [online]. Aktualizováno 12.12.2007 [16.12.2007], dostupné z: http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm
- Anonymus, 2010. Aktualizováno 5.6.2010 [16.6.2010], dostupné z: http://www.metafro.be/prelude/prelude_pic/HA01Allium_sativum.jpg
- FAOSTAT, 2012. FAOSTAT. (n.d.) *Acronym Finder*. (1988-2008). Aktualizováno 3.8.2012 [6.8.2012], dostupné z: <http://acronyms.thefreedictionary.com/FAOSTAT>
- Kozák, J. 2011. Pěstování česneku. Aktualizováno 22.3.2011 [20.4.2011], dostupné z: <http://www.k-cesnek.cz/pestovani.php>