

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



**Ozdravení kultur odrůd plamenky latnaté
(*Phlox paniculata*) od háďátek za použití kultur
in-vitro
Bakalářská práce**

Autor práce: David Nogly

Vedoucí práce: Ing. Pavel Matiska, Ph.D

© 2015/2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Ozdravení kultur Plaménky latnaté (*Phlox paniculata*) od háďátek za použití in-vitro kultur" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4.2016

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Pavlovi Matiskovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a pomoc při realizaci této práce, také bych chtěl také poděkovat paní Ing. Ludmile Augustinové za pomoc v laboraři. Mé poděkování také patří panu Ing. Miloslavovi Zouharovi, Ph.D. za objasnění problematiky hád'átek a zhotovení fotografií mikroskopovaných hád'átek.

Ozdravení kulturních odrůd plamenky latnaté (*Phlox paniculata*) od háďátek za použití kultur in-vitro

Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*) patří do čeledi jirnicovitých (*Polemoniaceae*). Je to velmi významná trvalka, která se uplatňuje jak v zahradní a parkové tvorbě, tak i k řezu. Ačkoliv se plamenky řadí mezi odolné rostliny proti škůdcům a patogenům, tak trpí na listová a stonková háďátka rodu *Ditylenchus* spp. Není známa metoda, která by 100 % zbavovala rostliny háďátek. Cílem této práce bylo ověřit hypotézu o metodě ozdravování rostlin pomocí in-vitro kultur a vytvoření čistých, zdravých kultur pro následné matečnice. Pokus byl sledován na vybraných deseti odrůdách a to 'Aňa Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen', 'Molodost', 'Igor Talkov', 'Jubilee', 'Laura', 'Mies Copijn', 'Sekret' a 'Winsdor'. Dále byla zkoumána regenerace kalusů, následné prorůstání a regenerace prýtů v závislosti na odrůdě.

Rostliny byly testovány na přítomnost háďátek rodu *Ditylenchus* spp., pomocí modifikované Baermannovy extrační techniky. Testovány byly všechny odrůdy kultivované ve skleníku. Pro pokus byly zvoleny listové segmenty o velikost 0,5 – 1 cm², následná kultivace byla prováděna na základním MS médiu (Murashige and Skoog, 1962) s 30 g . l⁻¹ sacharózy, pyridoxin 0,05 g . l⁻¹, thiamin 0,01 g . l⁻¹, glycin 0,20 g . l⁻¹ a kyseliny nikotinové 0,05 g . l⁻¹. Základní kultivace probíhala na MS médiu obohaceném o RRR a to 1,5 mg . l⁻¹ TDZ a 0,5 mg . l⁻¹ IAA pro iniciaci růstu kalusů a prorůstání regenerovaných prýtů. Bylo ověřeno, že při dané koncentraci RRR je regenerace kalusů téměř rovná 100 % u většiny zkoumaných odrůd. Nejlepší výsledky dosahovaly odrůdy 'Aňa Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen' a 'Molodost' i při opakovaném testování. V další části testování se prokázaly pozitivní podmínky pro regeneraci a prorůstání prýtů při kultivaci v řízeném prostředí, oproti neregulovanému prostředí. Explantáty v řízeném prostředí dosahovaly v průměru o 0,33 vyšší tvorbou prýtů na kalus. Úspěšným ozdravením kultur od škůdce *Ditylenchus dipsaci* pomocí explantátových kultur byla ověřena počáteční hypotéza, kdy výsledné explantáty převáděné do *ex-vitro* podmínek byly 100 % bez výskytu škůdce. V průběhu testování, kalusové kultury rostlé na MS médiu 1,5 mg . l⁻¹ TDZ a 0,5 mg . l⁻¹ IAA vykazovaly určitou míru výskytu háďátek, ale následným pasážováním byly i zbylé populace háďátek eliminovány.

Klíčová slova: *phlox paniculata*, háďátka, in vitro, regenerace kalusu, ozdravování rostlin

Healing of cultural varieties paniculate phlox (*Phlox paniculata*) from nematodes using in-vitro cultures

Phlox paniculata belongs to the family *Polemoniaceae*. *Phlox paniculata* is very important perennial which is used in common gardens, park landscaping and also to produce cut flowers. Although garden phlox are classified as resistant plants to pests and pathogens, they suffer from leaf and stem nematodes of genus *Ditylenchus* spp. Method eliminating these nematodes from plants for 100 % is still unknown. This thesis investigates the possibility of eliminating nematodes by using explant cultures and creating healthy plants for future mother plants of *Phlox paniculata*. For this experiment were chosen 10 varieties, 'Aña Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen', 'Molodost', Igor Talkov', 'Jubilee', 'Laura', 'Mies Copijn', 'Sekret' and 'Winsdor'. These plants were also researched for regeneration of calluses and growing ratio of shoots according to their varieties.

Plants were tested for presence of nematodes *Ditylenchus dipsaci* by using modified Baermann Technique. All varieties of *Phlox paniculata* were grown in greenhouse and all of them were tested. For experiment were chosen leaf segments measuring 0,5 - 1 cm² and the cultivation took place on MS medium (Murashige and Skoog 1962) + 30 g sucrose, pyridoxine 0,5 mg . l⁻¹, thiamine 0,5 mg . l⁻¹, glycine 2 mg . l⁻¹, nicotinic acid 0,05 mg . l⁻¹. Leaf segments were placed to MS medium enriched by 1,5 mg . l⁻¹ TDZ (Thidiazuron) and 0,5 mg . l⁻¹ IAA (Indole-3-acetic acid). Callus regeneration at the level of plant growth regulators was almost fully verified during this experiment. Best results were obtained from following varieties 'Aña Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen' and 'Molodost'. These results were also obtained from repeated experiment. Positive influence of controlled conditions to growing shoots and callus regeneration was also proved. Explants which were grown in controlled conditions reached higher efficiency on average 0,33 shoots per callus.

By successful recovery of the plants from pests *Ditylenchus dipsaci* using explant cultures, it was verified the initial hypothesis, where resulting explants are transferred to ex-vitro conditions were 100 % pest free. Although, callus cultures grown on MS medium of 1,5 mg . l⁻¹ TDZ and 0,5 mg . l⁻¹ IAA showed some degree of nematode occurrence during testing, consequent passage eliminated the remaining population of nematodes.

Keywords: phlox paniculata, nematodes, in vitro, callus regeneration, healing of plants

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Plamenka latnatá (<i>Phlox paniculata</i>).....	3
3.1.1	Klasifikace	3
3.1.2	Plamenka (<i>Phlox</i>).....	3
3.1.3	Plamenka latnatá (<i>Phlox paniculata</i>).....	3
3.1.4	Požadavky stanoviště a nároky	4
3.1.5	Škůdci a choroby	4
3.1.6	Množení	5
3.1.7	Odrůdy	5
3.1.7.1	'Aňa Gaganova'.....	6
3.1.7.2	'Blue Paradise'.....	7
3.1.7.3	'Errötense Mädchen'	7
3.1.7.4	'Laura'	7
3.1.7.5	'Molodost'	8
3.1.7.6	'Mies Copijn'.....	8
3.1.7.7	'Igor Talkov'.....	9
3.1.7.8	'Jubilee'	9
3.1.7.9	'Sekret'	9
3.1.7.10	'Winsdor'	10
3.2	<i>Nematoda</i> – hlístice.....	10
3.2.1	Morfologie a anatomie.....	10
3.2.2	Životní cyklus	11
3.2.3	Klasifikace	12

3.2.4	<i>Ditylenchus</i> spp.....	12
3.2.5	Izolace háďátek z rostliného materiálu	12
3.2.6	Izolace háďátek z půdního vzorku	13
3.2.7	Ovlivňování rostlin háďátkami	13
3.2.8	Poškožování rostlin čeledi <i>Phlox</i> háďátkem rodem <i>Ditylenchus</i> spp.....	14
3.2.8	Ochrana před háďátkama	14
3.3	Explantátové kultury	14
3.3.1	Základní principy explantátových kultur	15
3.3.2	Vybavení a podmínky práce v laboratoři.....	16
3.3.3	Sterizace.....	16
3.3.3.1	Sterilizace laboratoře	16
3.3.3.2	Sterilizace nástrojů a skla	16
3.3.3.3	Sterilizace živných roztoků (Autoklávování).....	17
3.3.3.4	Aseptický box (flow-box) a práce v něm	17
3.3.4	Kultivační média.....	18
3.4	Fytohormony a regulační látky	19
3.4.1	Auxiny	20
3.4.2	Giberliny	20
3.4.3	Cytokyniny.....	20
3.5	Metody mikropropagace rostlin	21
3.5.1	Produkce rostlin axilárních pupenů	21
3.5.2	Produkce rostlin tvorbou adventivních prýtu nebo embryí	21
3.5.3	Množení přímou morfogenezí	22
3.5.3.1	Přímá tvorba adventivních pupenů	22
3.5.3.2	Přímá embryogeneze	22
3.5.4	Množení nepřímou morfogenezí.....	23
3.5.4.1	Odvození kalusu	23

3.5.4.2	Organogeneze v kalusové kultuře	24
3.5.5	Množení rostlin nepřímou somatickou embryogenezí.....	24
3.6	Pokusy.....	24
3.7	Mikropropagace	26
3.7.1	Výběr matečné rostliny.....	26
3.7.2	Odvození aseptické kultury	26
3.7.3	Fáze proliferace explantátové kultury.....	27
3.7.4	Zakořeňování <i>in vitro</i>	28
3.7.5	Zakořeňování <i>in vivo</i> a aklimatizace	28
4	Metodika	30
4.1	Pracovní, kultivační podmínky a vybavení	30
4.2	Kultivační médium, regulátory rostlinného růstu	31
4.2.1	Příprava média	31
4.2.2	Použité varianty	33
4.3	Odběr explantátů, následné ošetření	34
4.4	Testování rostliných kultur na výskyt háďátek	35
4.5	Založení pokusu a jeho průběh	36
4.5.1	Kultivace kalusů	36
4.5.2	Pasážování prýtů	37
4.5.3	Zakořeňování a přenos do substrátu	37
4.6	Vyhodnocování výsledků.....	38
5	Výsledky	39
5.1	Výsledky jednotlivých postupů.....	39
5.1.1	Desinfekce listových vzorků.....	39
5.1.2	Odběr a regenerace kalusů	39
5.1.3	Regenerace prýtů	40

6	Diskuze.....	47
7	Závěr	50
8	Seznam literatury	51
9	Seznam fotografií.....	53
10	Seznam použitých zkratk.....	55

1 Úvod

Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*) se řadí mezi vytrvalé rostliny, která patří do čeledi jirnicovitých (*Polemoniaceae*). Tato rostlina pochází ze Severní Ameriky. Její původní oblasti jsou především východní a střední část USA, odkud byla introdukována do celé Evropy a později do celého světa. V dnešní době existuje mnoho odrůd, od ranných, polopozdních, pozdních či s širokou paletou barev od bílé, přes růžové, červené až modré tóny. Tyto trvalky se uplatňují především v zahradních či parkových výsadbách, některé odrůdy se hodí také pro řez květu. Ačkoliv se řadí mezi odolné rostliny, přesto bývají napadány houbovými chrobami a to především padlím, či skvrnitostí listů. Mezi škůdce patří mšice a svilušky. Tyto patogeny však můžeme léčit, největším nebezpečím pro plamenky se tak stávají hád'átka.

Hád'átka škodící na *Phlox paniculata* bývají nejčastěji rodu *Ditylenchus* spp. Mezi majoritní zástupce patří *Ditylenchus dipsaci*. Tento parazit je rozšířen po Evropě, Asii, Americe a to především v mírných pásmech těchto kontinentů. Patří mezi nejničivější parazitické hlístice a díky své variabilitě napadá široké spektrum rostlin a způsobuje značné hospodářské škody jak na zemědělských plodinách jako vojtěška, bob, tabák či cibule tak i na rostlinách okrasných jako jsou tulipány, hyacinty či plamenky. Hád'átka se z napadených rostlin velmi špatně odstraňují a tak je nejčastější ochrana je prevence.

Tkáňové kultury *in-vitro* se nevyužívají jen pro namnožování rostlin, ale také se využívají často pro ozdravování rostlin napadených bakteriálními či virovými patogeny. Pro tuto práci bude vyzkoušeno zda-li je tato metoda schopna eliminovat také stonková a listová hád'átka. Ozdravování pomocí *in-vitro* kultur především probíhá pomocí organogeneze.

2 Cíl práce

Cílem této práce je ověřit možnost ozdravování rostlin plamenky latnaté (*Phlox paniculata*), od škodlivých organismů a to především listových a stonkových háďátek v podmínkách *in-vitro* kultur.

Poté navrhnout případnou změnu postupů, či navrhnout metodiku při neúspěchu pro kvalitnější a zdravější výstupní materiál.

3 Literární rešerše

3.1 Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*)

3.1.1 Klasifikace

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Trachebionta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Řád: jirnicotvaré (*Polemoniales*)

Čeleď: jirnicovité (*Polemoniaceae*)

Rod: plamenka (*Phlox*)

Druh: plamenka latnatá (*Phlox paniculata*)

(Novák a Skalický, 2012)

3.1.2 Plamenka (*Phlox*)

Celý rod Plamenek obsahuje kolem 60 druhů vyskytujících se především v Severní Americe a jeden druh, který lze nalézt na Sibiři. Phloxy jsou vytrvalé, výjimečně jednoleté byliny. Listy jsou vstřícně postavené a v horní části bývají střídavé, celokrajné. Květy jsou uspořádány do vrcholíků nebo lat, někdy bývají rozloženy i samostatně. Mezi základní barvy květu patří bílá, růžová, červená, fialová nebo modrá. Nízké druhy kvetou většinou na jaře a v létě, vysoké druhy pak v polovině léta nebo na konci léta.

(Wehrhahn, 1952)

3.1.3 Plamenka latnatá (*Phlox paniculata*)

Plamenka latnatá – *Phlox paniculata* pochází z východních oblastí Severní Ameriky, kde roste na březích řek, hlavně podél Ohia, v živné půdě téměř s neutrální reakcí. Byla poprvé objevena v roce 1700, v roce 1732 se tato plamenka vydala nacestu do Evropy, nejdříve do Francie, kde se její kultury ujal zahradník Lierval a zároveň i známý šlechtitel P. L.V. Lemoine (1823 – 1911), jenž se rovněž věnoval zušlechťování této plamenky.

(Böhm, 1991)

Četné kulturní formy jsou mnohem větší než původní druhy. Dosahují výšky do 150 cm i více, květy mají průměr přes 5 cm a jsou různých barev, čistých i smíšených tónů, často s odlišně zbarveným středem. Všechny nově vyšlechtěné odrůdy, stejně jako původní druh příjemně voní. Podle doby kvetení se zahradní plamenky dělí do tří skupin: rané kvetou v první polovině června, střední - začínají kvést v druhé polovině července a pozdní vykvétají v druhé polovině srpna

(Golovkin a kol, 1986)

3.1.4 Požadavky stanoviště a nároky

Tento druh pochází z vlhkých, někdy i záplavových oblastí přechodu lučního a lesního společenstva. Jejich stanovištní adaptabilita je veliká a souvisí zřejmě i s velkým genetickým potenciálem. Obecně jim vyhovuje každá běžná zahradní půda, spíše vlhčí, bohatá na humus a dostatečně osluněné stanoviště či polostín. Plamenky nemají příliš rády vysoké letní teploty spojené s úpalem. V teplejších polohách dávají přednost přistíněným stanovištím.

(Matiska, 2005)

Pro zdárnou kulturu vyžadují plemky pečlivě zpracovanou, hád'átkem nezapomřenou, přiměřeně vlhkou a živnou půdu. Za sucha jsou vděčné za dostatečnou zálivku. Na mírně zastíněných stanovištích rozkvétají plamenky asi o 14 dní později než na výsluní.

(Böhm, 1991)

3.1.5 Škůdci a choroby

Plamenky patří mezi poměrně odolné rostliny, které nejsou náchylné příliš na choroby a škůdce. Pokud jsou napadeny se jedná o houbové choroby (padlí, skvrnitosti listů), které nejčastěji napadají listové plochy rostliny.

Padlí může být významným problémem pro *Phlox paniculata* a obzvláště jeho odrůdy. Rezistence nebo náchylnost k infekci padlí je regionální a mívají sezónní charakter. Například odrůdy, které jsou odolné v severnějších regionech nejsou tak často odolné i v teplejších, vlhkých oblastech s delším vegetačním obdobím. Stejným způsobem je proměnlivé i počasí, kdy v jednom roce vytváří příznivé podmínky pro infekci padlí a v příštím již ne.

(Armitage, 2008)

Nejčastějším, každoročně se vyskytujícím listovým onemocněním plamenky je padlí *Erysiphe magnicellulata* a *Spaerotheca fusca*. Objevuje se především za vlhkého počasí

na listech, stoncích a i květech v podobě moučnatých bělavých povlaků. Na těžších, nadměrně vlhkých půdách se může objevit askochytová listová skvrnitost a odumírání výhonů, které jsou způsobeny houbou *Ascochyta phlogis*. Patogen, rozšířený především v Severní Americe, způsobuje žloutnutí a odumírání výhonů *Phlox subulata* i *Phlox paniculata*. Na listech se tvoří protažené či nepravidelně šedivé, od středu blednoucí skvrny. Postižení listů se velmi podobá septoriové listové skvrnitosti (*Septoria phlogis*). Na listech jsou viditelné okrouhlé, antokyanové skvrny s difuzním okrajem a často tečkovitě vyběleným středem. Současně s houbovými patogeny se mohou vyskytnout na bázi stonku jednoletých a keříčkovitých plamenek (*P. subulata*) parazitická stonková háďátka (*Ditylenchus dipsaci*), která poškození houbami ještě zvýrazňují. Napadené výhony jsou ztloustlé, u starších výhonů s podouhlými prasklinami, stácejí se, přepadávají. Listy od stonku báze jsou žlutozelené, deformované, s podvinutými okraji a vadnou. (Šafránková, 2006)

Typickými příznaky napadení háďátkami jsou sklovitě oddělitelné stonky, deformované, odlišně zbarvené listy a žalostný stav rostliny. Zatím neexistují žádné ochranné prostředky, a tudíž je nutno napadené rostliny ihned vyjmout z půdy a spálit. Na zamořených záhonech už nelze plamenky pěstovat. (Böhm, 1991)

3.1.6 Množení

Rozmnožují se v naprosté většině vegetativně – řízkováním ze stonkových či vrcholových řízků. Řízkování je možné po celou dobu vegetace a při zimování rostlin ve studenem či mírně temperovaném skleníku (5 – 8 °C) i během zimy. Řízky koření při teplotě 15 – 20 °C během 2 – 4 týdnů. Velmi dobře je lze použít i pro hrnkovou kulturu s přirychlením. (Hanzelka, 2006)

Množí se hlavně na dělení silnějších trsů, ale též kořenovými řízků na jaře, jakmile dosáhnou výhonky délky asi 20 cm. (Böhm, 1991)

3.1.7 Odrůdy

Plamenka latnatá představuje klasiku mezi trvalkami. Celosvětově sortiment čítá několik stovek odrůd a nové kultivary stále vznikají. Historie její introdukce sahá do roku 1730, kdy byla dovezena do Anglie. Vlastní systematické šlechtění začíná zhruba o 100 let později, v roce 1839 ve Francii u šlechtitele Lierval. Z jeho práce vycházeli i další šlechtitelé v Belgii a Anglii. Současný dostupný evropský sortiment pochází pak zejména z dílny německých šlechtitelů K. Foestera, A. Schöllhammera, G. Arendse a dalších. V Nizozemsku

vzniklo několik velmi atraktivních odrůd v trvalkové školce rodiny Ruys, ze současných šlechtitelů lze zmínit jméno Coen Jansen, Jan Verschoor. Příkladem anglických šlechtitelů je Alan Bloom. Stranou pozornosti stojí velmi rozsáhlá skupina ruského šlechtění, jehož tradice sahá až do 20. let 20. století a v současné době čítá několik stovek odrůd. Důvody, proč se tyto odrůdy nerozšířily do střední a západní Evropy, je zřejmě třeba hledat v relativní uzavřenosti ruského trhu, jistou roli zřejmě hraje i jazyková bariéra a rovněž historicky daná omezení pro volný pohyb osob. (Hanzelka, 2009)

Zlatou dobu šlechtění plamenky latnaté – *Phlox paniculata* (*Phlox x hortorum*), kdy bylo získáno nejvíce nejhodnotějších odrůd, je prvních padesát let tohoto století. Záslouhou vynikajících pěstitelů a šlechtitelů trvalek v SRN a Holandsku, např. K. Foerster, G. Arendse, Ruyse a dalších, jejichž jména jsou pojmem v zahraničím světě, vzniklo mnoho nádherných odrůd. (Böhm, 1991)

Celá řada ruských odrůd vzniká s poměrně velkými květy, které mají v průměru i více než čtyři centimetry (obvyklá velikost je spíše kolem 3 cm). Početnou skupinu tvoří i tzv. kouřové plamenky a právě tyto odrůdy lze označit za velmi typické pro ruské šlechtění. Pozornost je zde věnována i zdravotnímu stavu a některé odrůdy jsou uváděny jako odolné vůči padlí nebo listovým skvrnitostem. Díky svému více „kontinentálnímu“ původu lze předpokládat i poměrně vysokou mrazuvzdornost. (Hanzelka, 2009)

3.1.7.1 'Aňa Gaganova'

Tato poměrně stará odrůda *Phlox paniculata* pojmenovaná jako 'Aňa Gaganova' je vyšlechtěna v letech 1939 z rukou ruského šlechtitele Pavla Gagonova který ji pojmenoval po své ženě. Aňa Gaganova dorůstá do výšky 70 cm. Kveté v období od července do srpna. Květenství je velká kulovitá, lehce kuželovitá lata složená z pětilaločnatých květů o velikosti 4,5 cm, které se vybarvují do korálově růžové barvy. Uprostřed vnitřního růžového středu květu se nachází velká bílá hvězda, která na přímém slunci bledne. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr 1 Odrůda 'Aňa Gaganova'
Zdroj: <<http://www.daylily-phlox.eu/>>

3.1.7.2 'Blue Paradise'

Odrůda 'Blue Paradise' pochází z rukou proslulého holandského zahradního architekta Pieta Oudolfa. Tato odrůda vyniká nad ostatním resistencí proti plísňovým onemocněním. 'Blue Paradise' dorůstá do výšky 100 - 150 cm, do šířky se rozsáhne o 10 - 50 cm. Vykvétá v měsících červenec až srpen. Květenství je kulovitá, kuželovitá lata, střední hustoty a velikosti. Barva květů je silně specifická, během slunečného dne se 'Blue Paradise' zbarvuje do fialového zbarvení s tmavě fialovými kruhy. Během oblačného počasí, v dopoledních hodinách či během noci se však 'Blue Paradise' zbarvuje do modrých odstínů s tmavě modrofialovými kruhy. Okvětní plátky jsou mírně zvlněné. Patří mezi nejvíce výstřední modrokvěté plamenky. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr 2 Odrůda 'Blue Paradise'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

3.1.7.3 'Errötense Mädchen'

Odrůda plamenku latnatého 'Errötendes Mädchen' pochází od Peter zur Linden ze šlechtitelské stanice Osnabrücker Staudenkulturen v Německu. Tato odrůda dorůstá do výšky 90 – 100 cm a do šířky 40 – 50 cm. Vykvétá v období června a bohatě kvete až do srpna. Květenství je kulatá, kuželovitě pyramidální lata, střední hustoty. Velikost květu je 4,2 - 4,4 cm a bělavě růžové barvy s tmavě růžovým hvězdovitým středem. Květní plátky jsou na koncích plátku mírně zvlněné. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr 3 Odrůda 'Errötense Mädchen'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

3.1.7.4 'Laura'

Tato odrůda je známa také pod názvem 'Uspech', řadí se mezi odrůdy pocházející z Ruska. Dorůstá do výšky 60 cm. Květenstvím je kónické kuželovité květenství. Jednotlivé květy jsou velké 5,5 cm v průměru. Zabarveny jsou do tmavofialové barvy s velkou bílou hvězdou ve středu květu. Vykvétá na



Obr 4 Odrůda 'Laura'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

konci června. Vytváří pevné kompaktní a silně rostoucí trsy. Jsou poměrně odolné a netrpí příliš na patogeny. (Russian Phlox Society, 2013)

3.1.7.5 'Molodost'

Odrůda vyšletěná v letech 1961 v Rusku šlechtitelkou Skrastyn, která vyšlechtila mnoho kvalitních odrůd. Odrůda má vysokou odolnost proti houbovým chorobám a také proti nízkým teplotám. 'Molodost' vyrůstá do výšky 90 cm výjimečně přes 100 cm a do šířky 50 cm. Květenství je kónické, kuželovité a husté. Jednotlivé květy jsou pětilisté, trubkovité velké 4 cm. Průměrná velikost květenství je 16 cm. Barva květů je světle růžová s žíháním a červeno růžovým středem. Kveté od začátku července až do konce srpna. Listy jsou tmavě zelené kopinaté a tuhé. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr. 5 Odrůda 'Molodost'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

3.1.7.6 'Mies Copijn'

'Mies Copijn' patří mezi další odrůdy vyšlechtěny v holandsku. Tato odrůda byla vyšlechtěn Henrikem Copijnem (holandským zahradním architektovi a šlechtiteli) po kterém byla tato odrůda také pojmenována. Odrůda má vysokou odolnost proti sviluškám a je středně rezistentní proti houbovým chorobám. Vyrůstá do výšky 70 cm a do šířky 45 cm. Květenstvím je kulovitá lata, která je složená z pětilistých, trubkovitých květů. Velikost jednotlivých květů je od 3,5 - 4 cm. Květy jsou světle růžové s jemným žíháním a tmavě vínovým středem. Květní plátky jsou mírně zvlňené na koncích plátků. 'Mies Copijn' vykvétá v červenci a kvete až do konce srpna. Listy jsou kopinaté, vstřícné, úzké a dlouhé až 10 cm, jsou zbarveny do tmavě zelené barvy a mohou mít tmavě červené ožnění na krajích listů. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr. 6 Odrůda 'Mies Copijn'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

3.1.7.7 'Igor Talkov'

Tato odrůda *Phlox paniculata* 'Igor Talkov' patří mezi ruské odrůdy. Tuto odrůdu vyšlechtila v letech 1987 již výše zmiňovaná Elena Konstatinova. Dorůstá do výšky 70 cm a do šířky 35 – 40 cm. Květenstvím je polokulovitá lata složená z trubkovitých, pětिलistých květů které jsou v průměru veliké 3,7 – 4 cm. Vykvétá na konci června a kvete až do srpna. Tato odrůda je lehce podobná v barevnosti odrůdě 'Blue Paradise'. Vykvétá růžově se světlým středem a světle bílým žíháním ze středu květu. Při soumraku nebo při oblačném počasí se tato odrůda však zbarvuje do fialovo modré barvy. Okvětní lístky jsou mírně zvlněné. (Russian Phlox Society, 2013)



Obr. 7 Odrůda 'Igor Talkov'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

3.1.7.8 'Jubilee'

Odrůda 'Jubilee' se řadí mezi ruské odrůdy *Phlox paniculata*, která pochází z Litvy. Je to kompaktní, vysoko roustoucí odrůda, která dorůstá do výšky kolem 75 cm a do šířky 60 cm. Květenství je kuželovitá lata, pětिलistých, trubkovitých, vonných květů. Tyto květy jsou temně růžovo, fuchsiové barvy s kontrastním růžovitě červeným středem (okem). Odrůda 'Jubilee' vykvétá od časného léta (červen) až do brzkého podzimu (srpen). Tato odrůda je vhodná pro řez.



Obr. 8 Odrůda 'Jubilee'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

(Russian Phlox Society, 2013)

3.1.7.9 'Sekret'

Tato odrůda pochází z rukou ruských šlechtitelů. Dorůstá výšky 70 cm a rozrůstá se do šířky 60 cm. Květenstvím jest velké kuželovité, kónické květenství. Velikost jednotlivých květů je 3,7 cm v průměru. Růžové květy se světlejším středem a malým tmavým okem uprostřed. Na květních plátcích se nachází také krémově šedé povlaky. Má solidní stonek a vytváří



Obr. 9 Odrůda 'Sekret'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

kompaktní trsy. Tato odrůda je velkolepě odlišná od ostatních odrůd. (Russian Phlox Society, 2013)

3.1.7.10 'Windsor'

Odrůda vyšlechtěná v Anglii v letech 1918, oblíbená pro pro barvu květů a kompaktní vzrůst. *Phlox paniculata* 'Windsor' patří mezi vysoce rostoucí odrůdy. Dorůstá do výšky 90 - 100 cm a rozrůstá se do šířky 60 cm. Má úzce kopinaté, vstříčné listy, které jsou tmavě zelené. Květenství je polokulovitá, kuželovitá lata složená z pětičetných, trubkovitých květů, které jsou vonné a jsou pastelově růžové s tmavě růžovým středem a slabě růžovým žiháním ze středu. 'Windsor' kvete od července až do září. Upřednostňuje polostinné stanoviště a uplatňuje se jak v trvalkových výsadbách tak také jako květina k řezu. Odrůda 'Windsor' je středně resistantní proti houbovým chorobám.



Obr. 10 Odrůda 'Windsor'
Zdroj: <<http://www.helenium-phlox.de/>>

(Russian Phlox Society, 2012)

3.2 Nematoda – hlístice

Nematoda neboli háďátka / hlístice patří do říše zvířat. *Nematoda*, červovitě vypadající organismy ovšem do pravých červů mají taxonomicky daleko. Většina druhů háďátek žije volně ve sladkovodních vodách, slaných vodách nebo v půdě kde se živí mikroorganismy nebo mikroskopickými rostlinami a zvířaty. Poměrně velká část druhů háďátek žijí paraziticky a útočí na rostliny, zvířata ve kterých způsobují rozličné množství nemocí. Několik stovek druhů háďátek vlastní stylet kterými napichují pletiva živých rostlin a způsobují tak celosvětově velké množství rostlinných nemocí. (Agrios, 1936)

3.2.1 Morfologie a anatomie

Rostlinní parazité jsou velmi malé, dosahují velikostí od 300 do 1000 μm . Vyskytují se zde i výjimky o velikostech 4 mm x 15 - 35 μm . Jejich nepatrná velikost je v podstatě dělá

neviditelné okem, mohou však snado být pozorovány pod mikroskopem. Hád'átka jsou obecně úhořovitého tvaru s kruhovitým průřezem. Jeho tělo je hladké a nesegmentované, bez končetin nebo ostatních přívěšků. Samice některých druhů hlístic po oplodnění však narůstají do hruškovitého až oválovitého tvaru. Tělo hlístic je více méně transparentní. Je pokryto bezbarvou kutikulou, která je často označena pruhováním nebo jiným značením. Hlístice svlékají svoji pokožku při přechodu do juvenilního stádia. Tělní dutina je vyplněna tělní tekutinou, která cirkuluje celým tělem. Travícím system u hlístic je dutá trubice, která prochází od ústního otvoru přes jícen, střevo, konečník až do řitního otvoru. Přísavky, které se nachází podél ústního otvoru jsou většinou po šesti. Většina parazitických hád'átek parazitujících

na rostlinách mají navíc dutý stylet nebo kopí. Stylet je používán na vniknutí do rostlinných buněk, ze kterých čerpají živiny.

Rozmnožovací systém hlístic je dobře vyvinut. Samice mají jeden nebo dva vaječníky, které jsou následovány vejcovody do dělohy, která je zakončená vulvou. Samčí rozmnožovací orgány jsou podobné samičím až na rozdíl varlat, semených váčků a terminusu ve společném otvoru střeva. Rozmnožování rostlinných parazitických hlístic probíhá pomocí vajíček. Mohou být pohlavní nebo partenogenetické, často kvůli nedostatku samců. (Agrios, 1936)

3.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus většiny druhů rostlinných parazitických hlístic je obecně velmi podobný. Mladí jedinci se líhnou z vajíček a jejich prvotní vzhled a sktruktura je podobná jako u dospělých jedinců. Liší se pouze velikostí, na konci každého stádia růstu se svlékají a zvětšují si životní schránku. Všechny mladé hlístice mají čtyři stádia, přičemž první stádium jsou jedinci ve formě vajíček. Po překonání posledního stádia se diferencuje pohlaví jedinců na samce či samice. Samice mohou produkovat oplozená vajíčka po spáření se samcem, nebo v nepřítomnosti samců bez pohlavního styku partenogeneticky. Celý životní cyklus od vajíčka po vajíčko může být dokončen do 2 - 4 týdnů za optimálních podmínek prostředí. Při nižší teplotě se doba životního cyklu prodlužuje. U některých druhů hlístic jsou první dvě fáze cyklu neschopna infikovat rostliny a tak musí využívat energii dodanou z vajíček. Pokud v infekční fázi nedokáží najít hostitele, tak hrozí riziko vyhladovění. Juvenilní stádia mohou vyschnout a zůstat v klidu do příznivějších podmínek. Vajíčka mohou zůstat v půdě až po dobu několika let a čekat na příznivé podmínky. (Agrios, 1936)

3.2.3 Klasifikace

Říše: *Animalia*

Kmen: *Nematoda*

Řád: *Tylechida*

Podřád: *Tylenchina*

Nadčeleď: *Tylenchoidea*

Čeleď: *Anguinidae*

Rod: *Ditylenchus*

(Agrios, 1936)

3.2.4 *Ditylenchus* spp.

Rod *Ditylenchus* má v seznamu karanténních organismů ČR dva zástupce, jsou to *Ditylenchus dipsaci* a *Ditylenchus destructor*. Hlavními znaky při morfologické determinaci jsou: ostře kónický ocas, délka těla samičky (1,1 – 2,0 mm), apikální část těla mírně oddělena od obrysu těla, délka styletu samiček (10 – 13 μ m), střední bulbus obvykle oválný, tvar nasedání terminálního bulbu na počátek středního střeva, uspořádání oocytů, délka postvulválního děložního váčku, délka bursy copulatrix. (Zouhar a kol., 2002)

Háďátka zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*) je významný polyfágní škůdce, vyskytující se v mnoha hostitelsky specializovaných rasách. Bylo popsáno na více než 1200 rostlinných druzích. Z okrasných rostlin napadá druhy s podzemní hlízou či cibulí, ale i floxy, zvonky, hvozdíky, primule ad. Dospělé háďátka je přes 1 mm dlouhé. Je to endoparazit, napadající veškerá parenchymatická pletiva rostlin s výjimkou kořenů. Larva čtvrtého stadia se nazývá invazní a má schopnost překonávat v klidovém stavu nepříznivé podmínky po velmi dlouhou dobu. (Gaar a Čermák, 2012)

3.2.5 Izolace háďátek z rostlinného materiálu

Bez ohledu na rostlinný materiál, ze kterého chceme izolovat háďátka, tak začíná izolace háďátek stejně a to rozdrcením jak ručně tak i případně i nasekáním rostlinného materiálu na drobné částice. Nasekaná tkáň je poté umístěna do Baermannovi nálevky kterou zalejeme destilovanou vodou. Háďátka začnou opouštět prostředí rostlinného materiálu a s neschopností plavat či vznášet se ve vodě pomalu padají do spodní části nálevky, ze které je můžeme pak snadno izolovat. (Agrios, 1936)

3.2.6 Izolace háďátek z půdního vzorku

Pro izolaci háďátek z půdního vzorku můžeme využít Baermanovy metody, kdy odebereme vzorek půdy asi 100-300cm³. Hlístice jsou izolovány poté pomocí Baermanovi nálevky, která se skládá ze skleněného trychtýře, která ústí v gumovou hadičku, jenž je uzavřena svorka. Celá sestava je umístěna na stojanu a je naplněna vodou. Odebraný vzorek půdy umístíme do kádinky a kterou přiklopíme porézním a voděodolným papírem nebo jemnou textílií. Kádinku položíme dnem nahoru do trychtýře. Takto vzorek ponecháme několik hodin, nejlépe přes noc. Aktivní hlístice migrují přes porézní papír nebo látku do vody a následně klesají na dno do gumové hadičky. Více než 90 % získaných háďátek takto můžeme obdržet v prvních 5 - 8 ml roztoku. Následně umístíme hlístice do mělkých misek ze kterých můžeme snadno mikroskopovat nebo odebrat případně jeden vzorek na podrobnou analýzu. (Agrios, 1936)

3.2.7 Ovlivňování rostlin háďátkami

Přímé poškozování rostlin způsobeno háďátkama během konzumace, způsobují rostlinám pouze drobné a nepatrné poškození. Ukazuje se, že největší škody způsobují výměšky slin, které háďátka vstříkují do rostlin během parazitování. Některé druhy háďátek jsou rychlými konzumenty, nabodnou buněčnou stěnu, vstříknou slině látky do buňky a vyjmou část buněčného obsahu, poté se většinou přesouvají na buňky další. Ostatní rody háďátek se krmí mnohem pomaleji a zůstávají přísáty k buňce několik hodin až dní. Tento proces konzumace nutí rostliné buňky reagovat, což má za následek mrtvé tkáně nebo nezdravé kořenové špičky a pupeny, tvorby léz a zhroucení tkání, otoky a hálky různých druhů. Některé z těchto projevů jsou způsobeny rozpuštěním infikovaných tkání pomocí enzymů háďátek, které s nebo bez pomoci toxicity způsobují tkáňové rozpady a ve finále způsobují smrt buněk. Ostatní jsou postiženy abnormálním buněčným růstem, které potlačuje buněčné dělení, nebo naopak stimuluje buněčné dělení kontrlovaným způsobem a ve výsledku tvoří formace hálek nebo větší množství laterárních kořenů z místa infekce.

Rostliné nemoci způsobeny háďátkama jsou komplexní. Háďátka žijící v půdě způsobují často snížení schopnosti brát spodní vodu z půdy a zároveň získávat živiny z půd, což způsobuje symptomy vodního a výživového deficitu. Mezi nepřítis devastující poškození rostlin háďátkami řadíme mechanické poškození, které nicméně může být vstupní branou pro ostatní patogeny, které jsou poté primárně zodpovědné za onemocnění rostlin. Většinou se mechanické poškození projeví u rostlin až při velmi vysoké populaci háďátek.

(Agrios, 1936)

3.2.8 Poškožování rostlin čeledi *Phlox* hád'átkem rodem *Ditylenchus* spp.

Rod hád'átek *Ditylenchus* se vyskytuje na celém světě, převládá však a je obzvláště destruktivní v oblastních mírného pásma. Je to jedna z nejdestruktivnějších parazitických hlístic které napadají velké množství odrůdově odlišných rostlin, od vojtěšky, přes cibule, hyacint, tulipány, oves i plamenek. Na většině plodiných způsobuje *Ditylenchus* spp. obrovské ztráty tím, že zničí sazenice plodin, omezuje rostlinu zakrslým růstem, ničí cibule, nebo znohodnocuje rostliny tak, že nejsou způsobilé prodeje, či konzumace. (Agrios, 1936)

LaMondia (1999) zmiňuje, že společným znakem je abnormální růst. Listy mohou být zvlněné s normální šířkou listům, nebo mohou být zúžené až skoro vláknité. Stonky bývají oteklé v blízkosti vrcholů, zatímco bazální pupeny vykazují stimulovaný růst. Rostliny mohou být zakrnělé, většinou ani nevykvetají a umírají předčasně.

3.2.8 Ochrana před hád'átkama

Některé z metod, které efektivně kontrolují a redukují stavy hád'átek jsou již k dispozici, ačkoliv jsou omezeny faktory jako jsou náklady na ochranu, nebo druhem rostlin. Toto může ovlivňovat typ použité ochrany. Ochrana je nejčastěji charakteru prevence, jakožto používání čisté sadby, správně sestavené osevní postupy, krycí plodiny a používání resistantních odrůd. Mezi další ochrany můžeme řadit také biologickou ochranu jakožto přírodní, nebo geneticky upravené antagonistické bakterie a houby. Dále můžeme používat ochranu fyzikální, solarizaci či zaplavování. Můžeme také použít chemické ochrany a to použitím nematocid. V praxi se používá kombinace několika metod pro potlačení hád'átek škodících na rostlinách. Odlet 1950 se nematocidy používají výhradně jen pro efektivní ochranu před hád'átkami u vysokocných rostlin jakožto jsou například, cenné plodiny, květiny, zelenina, jahodníky, tabák a nebo školkařské materiály. S postupem času se muselo opustit od této chemické ochrany neboť škodili toxickými residui. (Agrios, 1936)

3.3 Explantátové kultury

Jednou z nejslibnější se rozvíjejících oblastí zemědělské biotechnologie je manipulace s vyššími rostlinami na úrovni izolovaných buněk, pletiv a orgánů. Komplex metod založený na kultivaci explantátových kultur (*in-vitro*), představuje v současné době nový netradiční systém šlechtění rostlin. (Novák, 1990)

Explantátové kultury rostlin (kultury rostliných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. (Kováč, 1995)

Explantátové kultury představují nejenom soubor metod pro vědecké studium, při nichž lze produkovat haploidy, překonávat fyziologické bariery při hybridizaci taxonometricky vzdálených druhů, ale jsou využívány i pro praktické účely. Jedná se především o rychlé klonové množení a šlechtění rostlin či případně kultivace izolovaných meristému jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí o čemž se budu více podrobněji věnovat v této práci.

Cílem explantátových kultur je získat novou rostlinu, jednu nebo více. Tato rostlina či rostliny mají být buď totožné s rostlinou, ze které byl odebírán původní explantát nebo se mají od ní naopak lišit. (Procházka a kol., 2002)

3.3.1 Základní principy explantátových kultur

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka – zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a cytoplazmě mechanismy umožňující realizace této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Procesem mitotického dělení vznikají dceřiné buňky, které se dále vyvíjejí a dochází k jejich diferenciaci. Stávají se jednotkami specializovaných pletiv.

Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale že jsou schopny dediferenciace a opětovného dělení. Buňky diferenciovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických. V rostlinném organismu, je totipotentní nejen zygota a meristematická buňka, ale i kterákoliv jiná rostlinná buňka. (Kováč, 1995)

Kultura ogranizovaných struktur rostlinného organismu (zárodků nebo meristémů) představuje systém udržení vysoké genetické stability materiálu. Kultivace ogranizovaných struktur, zejména meristémů, umožňují hromadně množit geneticky identické potomstvo (klon) nepohlavní cestou. (Novák, 1990)

Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, emrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. (Kováč, 1995)

3.3.2 Vybavení a podmínky práce v laboratoři

Laboratoř, ve které se mají realizovat explantátové kultury musí zahrnovat řadu základních zařízení a podmínek pro práci. Laboratoř, by měla obsahovat protory pro mytí skla a laboratorních pomůcek, prostor na přípravu a sterilizaci medií, skladovací prostory, prostory pro manipulaci s se sterilní kulturou a kultivační místnost (případně box) s řízenými kultivačními podmínkami.

Pro práci v laboratoři by se měli nadále dodržovat podmínky tak aby nedocházelo k znehodnocování sterilního materiálu či biologického materiálu. (Kováč, 1995)

3.3.3 Sterilizace

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Z tohoto důvodu je nezbytné zabývat se sterilitou rostlinného materiálu používaného jako explanát, sterilitou kultivačních medií a sterilitou prostředí, kterém jsou tkáňové kultury realizovány. Při nedodržení sterility v některém stupni kultivace dojde ke kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi. Živná média používaná pro tkáňové kultury rostlin mají totiž vhodné složení pro růst těchto všudypřítomných organismů. (Kováč, 1995)

3.3.3.1 Sterilizace laboratoře

Smith (2012) a Kováč (1995) doporučují pro sterilizaci prostředí pro práci v laboratorní místnosti germicidní zářivky. Kováč (1995) podotýká, že lze použít i horské slunce. Tyto zářivky efektivně ničí bakterie a jejich zárodky. Používání UV-záření pro sterilizaci se doporučuje používat zejména před započítím práce, případně v noci. Ultrafialové záření je totiž nebezpečné pro oči. Pro sterilizaci lze použít bakteriocidní či fungicidní přípravky kterými oťeme povrchy stěn. Bohužel tímto způsobem lze sterilizovat povrchy laboratoře ale ne vzduch, narozdíl od UV zářivek.

3.3.3.2 Sterilizace nástrojů a skla

Kovové nástroje, sklo, hliníkové fólie atd. mohou být sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru (při 140 °C 90 minut, při 120 °C 120 minut). Veškeré nástroje, které se takto sterilizují je nutné zabalit, popř. uzavřít (alobal). Nástroje, které byly sterilizovány

v horkovzdušném sterilizátoru se při práci opakovaně sterilizují opálením nad plamenem kahanu po jejich předchozím ponoření do 70 % ethanolu. (Kováč 1995)

3.3.3.3 Sterilizace živných roztoků (Autoklávování)

Sterilizace autoklávováním se provádí v autoklávu a jedná se o sterilizaci horkou parou za zvýšeného tlaku. Tento způsob sterilizace se používá pro sterilizaci vatových zátek, plastických uzávěrů, filtrů, skla, pipet a především pro sterilizaci medií. Sterilizace se provádí při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizace je u medií závislá na jejich objemu, u ostatního materiálu se používá doba 15- 20 minut.

Tlak by nemel přesahovat 140 kPa, protože vyšší tlak vede k rozkladu sacharidů a dalších termolabilních složek média. Termolabilní složky živného roztoku jako jsou např. proteiny, některé vitamíny a aminokyseliny, rostlinné extrakty, gibbereliny a některé cukry je nutné sterilizovat filtrací. K tomuto účelu se používají speciální membránové filtry, které mají velikost pórů menší než 0,2 μm. (Kováč, 1995)

Kováč (1995) nadále doporučuje médium spíše rozlít do více nádob o menším objemu a sterilizovat je kratší dobu, než sterilizovat větší objem média po delší dobu. A to z již výše uvedených problémů ohledně termolability některých složek živných roztoků.

3.3.3.4 Aseptický box (flow-box) a práce v něm

Podle Jha and Gosh (2005) aseptický box nebo-li flow-box je laboratorní zařízení které umožňuje práci ve sterilním prostředí. Prohání vzduch přes vysoce účinné HEPA filtry, které jsou schopny zachytit částice o velikosti 0,3 μm. Filtrovaný vzduch je hnán proti laborantovi a umožňuje tak práci ve sterilním prostředí.

Podle Kováče (1995) by jsme měli dodržovat následující zásady při práci ve flowboxu. A to nepoškozovat ochranou mřížku, mohlo by tak dojít k poškození filtrů. Před a po práci ve flowboxu by jsme měli setřít vnitřní strany roztokem ethanolu o 70%. Box je nutné spustit 15 minut před prací aby došlo k ustálení proudu vzduchu. Nadále není možno ve flowboxu kašlat či kýchat a hlava by měla být držena mimo pracovní prostor. Mezi největšími zdroji kontaminace patří sám laborant. Předměty, které vyžadují nejvyšší sterilitu se umisťují nejbliže k filtru.

3.3.4 Kultivační média

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média. Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharidy, zpěvňovací látky a růstové regulátory.

Jha and Gosh (2005) zmiňují, média používaná v rostlinných tkáňových kulturách obsahují vyživné látky, které jsou důležité pro růst a vývoj tkáňových kultur. Úspěch tkáňových kultur také velmi záleží na různých typech kultivačních médií. Různé typy rostlin požadují různé nastavení látkového složení kultivačních médií. Médium pro rostline explantáty je kompletní. Optimální složení média záleží na určitých rostlinných druzích a jejich použití, je možné, že podmínky pro pěstování rostlinných buněk jsou již dobře popsány, při nové práci s novými druhy musí být zjištěny pozorováním a experimenty. Složení kultivačního média může být také záměrně změněno pro podporu určitého procesu. Navrhnout jedno složení pro optimální růst všech rostlinných pletiv je velice obtížné navrhnout.

Kováč (1995) Jha and Gosh (2005) doporučují také věnovat při zhotovování živného média věnovat pozornost koncentraci vodíkových iontů. Obvykle se doporučuje pH 5,5 až 6,0. V některých případech 6,0 až 7,0. Příslušná hodnota pH se v případě potřeby upraví hydroxidem draselným, nebo kyselinou chlorovodíkovou (1 M) Nižší hodnota pH zhoršuje tuhnutí kultivačního média a při hodnotě vyšší se stává médium příliš tuhé.

Chemické složení a fyzikální vlastnosti média musí odpovídat požadavkům rostliny v různých fázích rozmnožovacího cyklu. V první etapě (založení kultury) se do média přidávají někdy antioxidanty ve druhé etapě se médium často obohacuje o látky, které stimulují tkáňovou proliferaci. Jedná se především o vyšší koncentrace cytokininů. Ve třetí etapě množení se do média přidávají především auxiny, podporující elohační fázi růstu a zakládání kořenů. (Kováč, 1995)

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Agar má oproti jiným gelizujícím látkám řadu výhod. Za prvé, je-li agar smíchán s vodou, dojde k vytvoření gelu při teplotě 60 - 100 °C který tuhne přibližně při 45 °C. Agarové gely jsou tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost agarového gelu je možné regulovat použitou

koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Agar se obvykle používá v koncentraci 0,8 - 1,0 %. (Kováč, 1995)

Momentálně máme poměrně velké množství popsaných kultivačních médií, které jsou označovány podle jejich autorů. Aktuálně je asi nejznámější MS médium pojmenované podle (Murashige and Skoog, 1962) nebo LS médium pojmenované podle (Linsmaier and Skoog 1965) Médium se používá velmi často, zejména tehdy, kdy je cílem kultivace regenerace rostlin. B5 médium a jeho různé deriváty se používají především pro kultivaci protoplastů a buňkových suspenzí. Je však také často používáno pro regeneraci rostlin. Hlavním rozdílem mezi MS a B5 je především mnohem nižší obsah dusíku v B5 mediu.

MS médium formulovali Murashige and Skoog (1962) za účelem *in-vitro* kultivace tabáku, posléze bylo zjištěno, že je mimořádně vhodné pro kultivaci širokého spektra explantátů různých rostlinných druhů a nyní je nejpoužívanějším živným médiem. (Kováč, 1995)

3.4 Fytohormony a regulační látky

Růstové regulátory rostlišujeme na přirozené (nativní) a syntetické. Nativní si rostlina sama tvoří k regulaci svého růstu a vývoje a označujeme je termínem rostlinné hormony neboli fytohormony. Syntetické růstové regulátory nejsou součástí metabolismu rostlin, ale při vnější aplikaci na rostliny působí na jejich růst povzbudivě (označujeme je jako stimulatory) nebo brzdivě (označujeme je jako retardanty)

Fytohormony jsou chemickými signály, které vzikají ve velmi nepatrném množství v určité části rostlin a jsou transportovány do jiné části a tam působí regulačně na různé procesy, především růstové, vývojové a pohybové. Na rozdíl od živočišných hormonů jsou fytohormony jen velmi málo specifické. Rozlišujeme tři skupiny fytohormonů převážně působících stimulačně (auxiny, giberliny a cytokininy) a dvě skupiny fytohormonů převážně působících inhibičně. (absciny a ethylen) (Procházka a kol. 2002)

Neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem, a na druhé straně neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný růstový proces. Tento pleiotropní účinek fytohormonů lze uvažovat jako následek interakcí dvou, resp. tří složek. Hlavní složkou je počet aktivních molekul fytohormonu spojených s místem jejich účinku v buňce. Tako hodnota závisí na biosyntéze a metabolismu fytohormonů i na regulaci jejich importu a exportu (tj. transportu). Druhou složkou je senzitivita buněk k endogenním fytohormonům. (Procházka a kol.,1997)

3.4.1 Auxiny

Hlavním auxinem je kyselina B-indolylacetová (IAA) vznikající z tryptofanu buď přes kyselinu B-indolylpyrohroznovou nebo přes tryptamin. Z přirozených indolických auxinů je známá i kyselina B-indolylmáslaná. Ze syntetických auxinů je nejdůležitější kyselina α-naftylacetová (NAA). Pro transport auxinů je typická polarita, ve stonku se auxin transportuje od vrcholu k bázi a v kořenu od báze k vrcholu. Nejnápadnější působení auxinu je podpora prodlužovacího růstu segmentů stonků. Auxiny stimulují dělení buněk a tvorbu adventivních kořenů, brzdí však růst pupený a opad listů a plodů. V rostlinách je auxin přítomen i v podobě tzv. konjugátů, esterů IAA s glukózou, myoinozitem nebo kyselinou asparaginovou. (Procházka a kol., 2002)

Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v kultivačním médiu. Iniclace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu k cytokininu vysoký. Je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventivních, či axilárních prýtů (Kováč, 1995).

Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu prýtů (Kováč, 1995).

3.4.2 Giberliny

Giberliny byly objeveny jako účinné látky houby *Gibberella fujikuroi* působící chorobu rýže, projevující se nápadným urychlením prodlužovacího růstu stébel. Jsou to diterpeny tvořící se v rostlině z kyseliny mevalonové. V současné době je známo 89 giberlinů označovaných jako GA₁, GA₂, GA₃.

Giberliny se tvoří v místech aktivního růstu zvl. v nejmladších listech, kořenových špičkách a v embryích semen. Vyskytují se v rostlinách jednak volně, jednak v podobě konjugátů, většinou glukozidů. Konjugáty jsou hojné zvláště v nezralých semenech. Nadále stimulují prodlužovací růst intaktních prýtů. Růst kořenů zpravidla nestimulují. (Procházka a kol., 2002)

3.4.3 Cytokyniny

Cytokyniny jsou látky, které v přítomnosti auxinů stimulují dělení buněk a podněcují diferenciaci pupenů a kořenů v kulturách *in-vitro*. S různými modifikacemi lze zevšeobecnit, že vysoký poměr cytokininu k auxinu stimuluje diferenciaci pupenů, zatímco opačný poměr obou hormonů podněcuje diferenciaci kořenů. Cytokyniny podporují větvení stonků

a potlačují větvení rostlin k nepříznivým podmínkám prostředí. (Procházka a kol., 2002, Jha and Gosh 2005)

Některé aromatické deriváty močoviny a thiomčoviny jsou vysoce aktivní v biotestech na cytokininy. Nejaktivnější jsou N,N'-difenyльмоčovina, N-fenyl-N'-pyridylmočovina a tidiazuron (TDZ) a jejich deriváty (Procházka a kol., 2002).

V současné době známe přes 30 přirozených cytokininů. Strukturálně všechny vycházejí z adeninu substituovaného na exocyklické aminoskupině v poloze N-6. Další skupina cytokininů obsahuje aromatický substituent. Patří sem zejména N6-benzyladenin a jeho deriváty s hydroxylovaným benzenovým jádrem v poloze *orto* a *meta*. Vše nasvědčuje tomu, že se uplatňují zejména při regulaci morfogeneze a zpomalování stárnutí rostlin (Procházka a kol., 1997).

V kulturách *in-vitro* je často užíván benzyladenin (BA). Cytokininovou aktivitu mají i některé deriváty močoviny. Podobně jako auxiny našly i cytokininy významné využití v kulturách *in-vitro* jako složka kultivačních médií. (Procházka a kol., 2002)

3.5 Metody mikropropagace rostlin

Kováč (1995) o ní pojednává ve smyslu, kdy se jedná v podstatě o množení rostlin indukcí tvorby prýtů z axilárních (úžlabních) pupenů nebo o tvorbu adventivních prýtů či adventivních somatických embryí a to buď: přímou morfogenezí, při které výše uvedené struktury vznikají přímo na částech orgánu, nebo pletiv a nebo nepřímou morfogenezí, kdy uvedené struktury vznikají z kalusového pletiva, nebo v suspenzní kultuře.

3.5.1 Produkce rostlin axilárních pupenů

Tato metoda představuje nejrozšířenější metodu kultivace *in vitro*. Její varianty představuje metoda kultivace vzrostných vrcholů a metoda kultivace jenonodálních stonkových segmentů. Obě jsou založeny na stimulaci růstu axilárních pupenů při potlačení apikální dominance. (Kováč, 1995).

3.5.2 Produkce rostlin tvorbou adventivních prýtu nebo embryí

U rostlin existuje schopnost přechodu diferencovaných buněk a pletiv do meristemického stavu charakterizovaného inenzivním buněčným dělením s následnou cytodiferenciací a regenerací orgánů, resp. celých rostlin. Rostlinná somatická buňka je totipotentní. Za určitých podmínek, které mohou být v podmínkách *in vitro* definovány

a kontrolovány, jsou morfogenetické procesy dovršeny regenerací celých rostlin. (Novák, 1990)

Diferenciace rostlin *in vitro* probíhá v těchto různých systémech.

- organizované struktury – meristemy a zygotická embrya
- diferenciované pletiva resp. komplexy pletiv
- pletiva na různém stupni dediferenciace, zejména ve formě kalusu
- izolované buňky a protoplasty

Morfogeneze každého uvedeného systému má své specifické vlastnosti, které se odrážejí jak při fyziologické regulaci, tak i genetické determinaci vývojových procesů.

(Novák, 1990)

K regeneraci může docházet přímo na izolovaném pletivu buď ze založených základů, nebo *de novo* tak, že buňka nebo buňky, které dediferenciovaly, se začnou podílet bezprostředně na vytváření nové struktury. V obou uvedených případech se jedná o regeneraci přímou. Jindy dělení meristematičtých buněk vnesených spolu s explantátem nebo vzniklých dediferenciací vede nejprve k vytváření kalusu a teprve v takto vzniklé kalusové kultuře dojde, většinou po změně kultivačních podmínek, k regeneraci nových struktur. (Procházka a kol., 2002).

3.5.3 Množení přímou morfogenezí

3.5.3.1 Přímá tvorba adventivních pupenů

Další důležitá metoda používaná k mikropropagaci je metoda založená na indukci tvorby adventivních pupenů. Podstatou metody je vznik pupenu z předem nediferenciovaných struktur typu axilárních, či apikálních pupenů. Adventivní pupeny vznikají z buněk explantátu po jejich dediferenciaci. Adventivní pupeny dávají vznik adventním prýtům, které je možné množit buď stejným způsobem, nodálními segmenty nebo pomocí axilárního větvení.

K indukci adventivních pupenů je možné použít kousků pletiv a orgánů. Po umístění explantátu na živné médium dochází za určitých podmínek k prorůstání těchto pupenů v nové rostliny. Výtěžnost tohoto způsobu rozmnožování je velmi vysoká. Na explantátu nemusí vždy vznikat rostliny, ale mohou se přímo vyvíjet rozmnožovací částice, např. cibulky. Tento jev můžeme pozorovat např. u lilií. (Kováč, 1995)

3.5.3.2 Přímá embryogeneze

Tento způsob množení je charakterizován přímým vznikem somatických embryí na primárních explantátech. Embrya vznikají z pletiv označovaných jako proembryonálně

determinovaná. Jedná se např. o pletiva zygotických embryí, děloh klíčnicích rostlin, hypokotyly klíčnicích rostlin atd. Tento způsob množení byl popsán např. u vojtěškym, citrusů, petržele atd.

(Kováč, 1995)

3.5.4 Množení nepřímou morfogenezí

Tato metoda je charakteristická vznikem kořenů, stonků, popř. celých rostlin z neorganizovaného kalusového pletiva. Protože tyto orgány nevznikají z původního pletiva mateřské rostliny označuje se tato organogeneze jako nepřímá. Množení probíhá v několika etapách.

3.5.4.1 Odvození kalusu

Novák (1990) zmiňuje, že proces odvození kalusu je charakterizován změnami vnitřního metabolismu, zejména syntézy DNA, RNA a protein, které kulminují v obnovení buněčného dělení dediferenciováných buněk. Ne všechny buňky reagují na nové prostředí kultury *in vitro* se stejnou odezvou. Mitotická aktivita je podmíněna řadou faktorů jako je, reakce na poranění, anaerobní prostředí, zvýšená dostupnost živin a rychlejší uvolňování inhibitorů, jakož i vliv světla na povrchové vrstvy explantátu. Průběh prvního mitotického dělení je náhodný, avšak následná dělení nabývají periklinální charakter a v místě proliferace se začne vytvářet ránové kambium. V dalším průběhu neorganizovaného růstu *in vitro* je kalusové pletivo složeno převážně z buněk parenchymatického typu.

Kalus představuje soubor nediferenciováných buněk. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. (Kováč, 1995)

Proces, při kterém trvalé pletivo resp. dediferenciované buňky revertují do meristemického stavu a vytvářejí neorganizovaný kalus, je považován za dediferenciaci. (Novák, 1990)

Kombinace růstových regulátorů a jejich koncentrační poměr v kultivačním médiu jsou rozhodující z hlediska růstu a diferenciaci buněk, pletiv a orgánů *in vitro*. Obecný model morfogeneze *in vitro* je založen na předpokladu, že vysoká koncentrace auxinu a nízká koncentrace cytokininu v médiu podmiňují proliferaci neorganizovaného kalusu. (Novák, 1990)

3.5.4.2 Organogeneze v kalusové kultuře

Vytvořený kalus resp. buňky suspenzní kultury jsou přeneseny na médium s nižší koncentrací auxinu a dochází k vytvoření orgánových základů. Významná je především produkce prýtlů, protože kořeny, které v kalusové kultuře vznikají nemají většinou vaskulární spojení s prýty. Proto často musí následovat třetí fáze – zakořeňování. Je realizována buď ve sterilních podmínkách, nebo jsou prýty po aplikaci auxinu na jejich bázi přeneseny do nesterilního substrátu. (Novák, 1990)

Při organogenezi se nová struktura může vyvíjet z jedné nebo i více buňek. Z toho vyplývá reálná možnost chimér, s čímž musíme počítat i v našich pokusech.

Stáří a fyziologický stav donorové rostliny má vliv na další regeneraci. Stáří rostliny i explantáty hůře snášejí stres po přenosu do kultury *in vitro*. V praxi se pro iniciaci kultur používají jak polní rostliny, tak i skleníkové kultury pěstované za řízených podmínek. (Rakouský, 2001)

3.5.5 Množení rostlin nepřímou somatickou embryogenezí

Adventivní nebo asexuální embryogeneze je vývoj zárodku z buňky, která není produktem gametické fúze. Tento jev je znám u celé řady druhů, kdy se embrya vyvíjejí *in situ*, nejčastěji z nucelárních buněk nebo z buněk suspensoru a integumentů, spolu se zygotickými zárodky. *In vivo* adventivní, resp. somatická embryogeneze je obecně omezená poze na pletiva semeníku a ostatní diferencované somatické buňky mohou tuto schopnost projevit jen v kultuře *in vitro*. (Novák, 1990)

3.6 Pokusy

Jain et al. (2002) zjistili, že kalusy získané z listových explantátů *Phlox paniculata* na klasickém MS médiu při koncentraci 3 % sacharózy plně pokryly řezné plochy a po 14 - 15 dnech kultivace pokryly celou plochu. Dále zjistili, že na médiích, které neobsahovali auxiny a cytokininy se nevyskytly žádné známky množení a tvorby kalusu na rostlinných explantátech. Intenzita tvorby kalusů byla větší s médiem, které obsahuje BA v kombinaci s IAA než při ostatních pokusech s Kn+IAA, Kn+NAA, BA+NAA. Médium s 0,5 mg/l BA a 2.0 mg/l IAA byl prokázán jako nejvíce efektivní v tvorbě kalusu. Lepší tvorba kalusu byla prokázána při používání nevyzrálých listových pletiv jak u vyzrálých.

Declerck a Korban (1995) zmiňuje, že byla vyvinuta vysoce účinná regenerace listových kalusů a následná vysoká tvorba prýtu ze skleníkově pěstované kultury *Phlox paniculata* pro odrůdu 'Franz Schubert' a 'Prospero'. V předběžném experimentu, TDZ a BA

(5 $\mu\text{mol/l}$) dohromady s 2.5 $\mu\text{mol/L}$ IAA inkudovala skoro 100 % regeneraci pro oba genotypy, obzvlášť pokud byly explantáty vystaveny růstu bez temnostní fáze. Navíc byly zjištěny významné rozdíly v regeneraci explantátů získaných z prvních, druhých a třetích odběrů. Byly zkoušeny čtyři různé koncentrace BA a TDZ (0,25, 1, 3 a 5 $\mu\text{mol/l}$) dohromady se třemi úrovněmi IAA (0, 0,5 a 1,0 5 $\mu\text{mol/l}$). Listové segmenty odrůdy 'Franz Schubert' vykazovaly významné rozdíly v regeneraci prýtů a celkově v kvalitě regenerovaných prýtů. (myšleno délka nejdelších výhonů). Výsledky analýzy hlavních komponentů ukazuje, že BA je celkově účinnější jak TDZ při indukci více výhonů a více regeneračních míst na explantátu.

Meristemové kultury a nebo thermoterapie jsou používány pro ozdravení matečního materiálu *Phlox paniculata* ('Blue Boy' 'Starfire') od virových onemocnění. Vrcholové a listové explantáty které byly posbírány ze zdravých rostlin byly kultivovány v *in vitro* podmínkách. Adventivní prýty byli pozorovány na základním MS médiu, obsahující cytokinin BA s přítomností, nebo bez přítomnosti auxinu NAA. Přidáním 0,4 mg/l thiaminu, 0,4 mg/l kyseliny listové a 40 mg/l adenin sulfát do MS média nemá vliv a zlepší úroveň regenerace. Množení a zakořeňování je druhově závislé. 'Blue Boy' odrůda regeneruje nejlépe z listových explantátů, zároveň tato odrůda z *in vitro* kultur má nižší regenerační úroveň než rostliny ze skleníku. 'Starfire' odrůda naproti tomu, selhal při regeneraci z listových explantátů. Zakořeňování adventivních prýtů za přítomnosti auxinu (IAA, NAA nebo IBA) s nebo bez BA bylo méně efektivní než *ex vitro* zakořeňování. (Fraga and Alonso, 2004)

LaMondia (1999) zjistil, že při pokusu o eliminaci háďátek *Ditylenchus dipsaci* v rostlinných kultúrách *Phlox subulata* aplikací dvou rozdílných insekticidů při různých koncentracích. Používán byl prostředek Avid s účinnou látkou Abamectin (koncentrace 0,005 mg . l⁻¹ , 0,011mg . l⁻¹), jako druhá varianta byl použit prostředek KnoxOut s účinnou látkou Diazinon (koncentrace 0,62 mg . l⁻¹ , 1,87 mg . l⁻¹) Aplikovány byly 4 aplikace postřikem po 7 dnech, v následujícím pokusu 6 aplikací se stejným časovým intervalem. Ačkoliv v prvním pokusu byla velká populace háďátek, tak výsledky ukázaly, že Abamectin ani Diazinon nebyly schopny kompletně redukovat výskyt *Ditylenchus dipsacii*. Při druhém pokusu byly použity vzorky s nižší populací *Ditylenchus dipsacii* a byly prokazatelně lépe kontrolovány šesti postřiky látkou Diazinon při koncentracích 0,62 mg . l⁻¹ a 1,87 mg . l⁻¹, kdy po 4. postřiku byl redukován výskyt *Ditylenchus dipsacii* na 6 – 8 % a po 6. postřiku na 1 – 2 % z 1 g rostlinné tkáně. Při použití adjuvantu Triton 27 s látkou abamectin způsoboval fytotoxicitu a nebyl dále zkoumán.

3.7 Mikropropagace

Vývoj rostlin v podmínkách in vitro je možné rozdělit do 4 základních stádií nebo fází. V prvním stádiu jde o odvození sterilní kultury – primokultury, která spočívá v odebrání vhodného explantátu a jeho sterilizaci a kultivaci na živném médiu. Materiál odvozený v primokultuře je potom využíván ve druhém stádiu, která se označuje jako stádium multiplikační či proliferační. Cílem druhého stádia je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat co největší počet nových rostlin, resp. nových explantátů cestou somatické embryogeneze, axilárního větvení, tvorby adventivních pupenů atd. Toto stádium může být opakováno pasážováním na téže proliferačním médiu nebo může následovat třetí stádium, které je většinou spojeno se zakořeňováním. Poslední čtvrté stádium představuje stádium převodu rostlin z kultury in vitro do podmínek in vivo a je spojeno někdy se zakořeňováním in vivo. (Kováč, 1995)

3.7.1 Výběr matečné rostliny

Podle Kováče (1995) by jsme při odběru materiálu pro odvození explantátové kultury je nutné znát přesně původ matečné rostliny – o jakou varietu či odrůdu se jedná.

Při výběru rostliny, pro odvození explantátové kultury je zapotřebí věnovat zvýšenou pozornost zdravotnímu stavu rostliny, zhodnotit její růstové schopnosti, fyziologický stav a vlastnosti, pro které by měla být vybraná rostlina množena. (Hradílek, 2005)

Úspěšnost odvození explantátové kultury je ovlivňována v závislosti na ročním období i na postavení odebírané části rostliny v rámci celé rostliny. Optimální termíny pro založení explantátové kultury se často liší od období maximálního růstu rostliny. Také mikrobiální kontaminace explantátu se liší v různých obdobích roku i na různých stanovištích. (Hradílek, 2005)

Nejlépeších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu. Vyjimku v tomto případě představuje odběr explantátů ze zásobních orgánů. (Kováč, 1995)

3.7.2 Odvození aseptické kultury

Po pečlivém výběru rostliny, ze které bude explantát odebrán při respektování vhodného časového období i místa, ze kterých bude explantát odebíran je možno přikročit k založení kultury. (Hradílek, 2005)

Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou desinfekcí pomocí jednoho nebo více desinfekčních činidel. Oplachování rostlin nebo jejich částí pod tekoucí vodou po dobu 30 minut až dvou hodin redukuje počet mikroorganismů přítomných na povrchu rostlin. (Kováč 1995)

Z faktorů, které snižují účinnost sterilizace je především přítomnost trichomů, které zabraňují přístupu desinfekčního roztoku až na povrch materiálu a tvorba vzduchových bublinek, uvolňovaných někdy z rostlinného materiálu, které rovněž lokálně brání přístupu sterilizačního roztoku k objektu. Tyto nedostatky lze odstranit poklepením na kádinku případně jemným třepáním a zejména přidáním několika kapek smáčedla do roztoku. (Hradílek, 2005)

Po opláchnutí se explantáty ponoří do desinfekčního roztoku. Desinfekční roztok má usmrtit mikroorganismy přítomné na povrchu explantátu a nemá poškodit vlastní explantát. Nejpoužívanější desinfekční činidla jsou chlrové vápno, 10 – 15 % roztok SAVO super a roztok Chloraminu B (1 – 5 %). Účinnost dezinfekce je možné také zvýšit přidáním několika kapek detergentu (JAR) do desinfekčního roztoku. Po dezinfekci resp. sterilizaci je nutné desinfekční roztok z explantátu dokonale odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poškozené konce explantátu se odstraní skalpelem a explantát se upraví do požadované velikosti popř. se z něho izolují vlastní explantáty. (Kováč, 1995)

3.7.3 Fáze proliferace explantátové kultury

Přenos explantátů z jednoho média na médium čerstvé se označuje jako pasážování. Pasážování se provádí pravidelně a jeho cílem je přenést explantát do nového prostředí zbaveného rostlinných exkretů, které explantát naprodukoval a které by mohly negativně ovlivnit jeho další růst. (Hradílek, 2005)

Rostlinný materiál je opakovaně pasážován na čerstvé médium, přičemž se v závislosti na dosaženém koeficientu množení zvyšuje počet explantátů v kultuře. (Kováč, 1995)

Explantát, který obsahuje vzrostlý vrchol může v závislosti na kultivačních podmínkách dávat vznik jednomu nebo velkému počtu nových prýtů. Nově vzniklý prýt opět zahrnuje apikální pupen a úžlabní pupeny. Jeho rozřezáváním na jednotlivé části je možné rostliny v explantátové kultuře dále množit. Po namnožení požadovaného množství prýtů pasážovány na médium stimulační zakořeňování. (Kováč, 1995)

3.7.4 Zakořeňování *in vitro*

Prýty odvozené v podmínkách *in vitro* mohou buď v podmínkách *in vitro*, nebo v podmínkách *in vivo*. (Hradílek, 2005)

Zakořeňování je významnou a často dosti obtížnou etapou mikropropagace. Nestačí jen, aby prýty vytvořili kořeny, ale také aby tyto kořeny byli funkční. Zakořeňování prýtů v sterilních podmínkách *in vitro*, je poměrně pracné a zvyšuje náklady na množení rostlin. Kořeny takto vzniklé, nejen že mohou být nefunkční, ale mohou postrádat kořenové vlásky a jsou velmi křehké a lámavé. (Hradílek, 2005)

V současné době se však, pokud je to možné, více využívá zakořeňování *in vivo*. Je to především dáno velmi vysokou cenou a pracností sterliního zakořeňování. Dalším důvodem je častá nefunkčnost kořenu vytvořených *in vitro* po přenesení rostlin do půdy. Kořeny vytvořené *in vitro* totiž postrádají velmi často kořenové vlášení, jsou velmi křehké a při přenosu do půdy se lámou. U některých druhů je možné vyvolat tvorbu kořenů pouze přenesením prýtů nebo shluků prýtů na médium prosté cytokininů. U většiny druhů však indukce tvorby kořenů vyžaduje navíc přítomnost auxinu. (Kováč, 1995)

3.7.5 Zakořeňování *in vivo* a aklimatizace

Zakořeňování prýtů odvozených *in vitro* v nesterilních, nebo polosterilních podmínkách na substrátech blízkých zahradnickým substrátům. (Hradílek, 2005)

Hradílek (2005) a Kováč (1995) doporučují při zakořeňování prýtů *in vivo* používat umělé půdy a porézní materiály jako perlit, vermikulit, směsi písku a rašeliny nebo čedičová vata.

Obecnou vlastností těchto materiálů a substrátů je snížený výskyt půdních mikroorganismů a možnosti částečné desinfekce substrátu. Substrát používaný k zakořeňování *in vivo* by měl mít slabě kyselou až neutrální reakci zajišťovanou dostatečnou aerací a měl by mít vysokou vodní kapacitu. (Hradílek, 2005)

Zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách se provádí tak, že se prýty pocházející ze pasážování jednotlivě izolují, ponoří se na několik sekund do roztoku auxinu a poté se zanoří svou bází do vlhkého substrátu. Prýty zakořeněné *in vitro* se po předchozím důkladném opláchnutí zbytků živného média ulpělého na kořenech opatrně přesadí do vlhkého substrátu. Kontaminaci rostlin po jejich přenosu do nesterilních podmínek je možné zabránit aplikací fungicidů na rostliny popř. do substrátu. Ve stádiu zakořeňování

in vivo je kromě dokonalého zakořenění rostlin nezbytná jejich aklimatizace na změněné podmínky zevního prostředí. Aklimatizace se především týká snížené vzdušné vlhkosti a přechodu na autotrofní způsob výživy. Požadavek na postupnou aklimatizaci na nižší vzdušnou vlhkost vychází z toho, že rostliny rostoucí v kultuře *in vitro* nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají velmi často nefukční průduchy. Tento jev se označuje vitrifikace a je způsobena vysokou vlhkostí v kultivačních nádobách. (Kováč, 1995)

4 Metodika

4.1 Pracovní, kultivační podmínky a vybavení

Veškerá práce, jenž byla prováděna s kulturami *in-vitro* a s pracemi jenž byly spojeny s *in-vitro* kulturami, byly prováděny v laboratoři vybavené pro práci s tkáňovými kulturami. Následná kultivace části explantátů byla prováděna ve stojanu se zářivkami, bez regulace teploty a druhá část kultur byla kultivována v prostředí kultivačního inkubátoru.

Kultivovace ve stojanu probíhala při konstantních světelných podmínkách, kdy explantáty nebyly vystaveny temnostní fázi. Tepelné podmínky ve stojanu byly proměnlivé neboť zde nebyla možná stálá regulace teploty. Byly závislé na podmínkách v místnosti kde byl stojan umístěn a na dalších vlivech, jenž tento prostor ovlivňoval (počasí, centrální topení, větrání), zároveň jednotlivé kultury byly ovlivňovány samotným zahříváním umístěných zářivek nad kulturami. Druhá část explantátů byla umístěna v kultivačním inkubátoru, kde byly podmínky stabilní a neměnné. Teplota v kultivačním boxu byla za světla 23 °C a během temnostní fáze 18 °C. Světelná fáze byla po dobu 16 hodin a temnostní fáze byla po dobu 8 hodin.

Výchozí kultury rostlin byly získány v již napěstované formě z Pražské botanické zahrady, nadále byly pěstovány ve sklenicích pro snížení kontaminace mikroorganismy, či jinými patogeny a pro ustálení podmínek pro růst a odběr listových explantátů.

Veškerá práce na *in-vitro* pokusech poté probíhala v aseptickém boxu (flow box), abychom dodrželi sterilní prostředí. Veškeré nástroje (skalpel, pinzeta), sklo (petriho misky, erlenmeyerovy baňky) byly sterilizovány pro následnou práci v autoklávu (standartní sterilizace – tlak 101,5 kPa teplota 121 °C, doba 20 minut), pro následnou práci byla pracovní plocha flow boxu sterilizována germicidní zářivkou umístěnou ve flowboxu po dobu 15 minut a následně postřikem ethanolu pro potlačení rozvoje a výskytu mikroorganismů a docílení sterility práce. Pro práci byly nástroje dále sterilizovány v roztoku ethanolu a následném opálením nad plamenem kahanu. Nezbytné je také důkladné umytí rukou, jejich desinfikace ethanolovým postřikem, nebo používání ochranných pomůcek a dodržování čistoty a pořádku v pracovním prostředí.

4.2 Kultivační médium, regulátory rostlinného růstu

Základní kultivační médium bylo vybráno Murashige a Skoog médium (zkráceně MS), které má víceméně univerzální využitelnost a je obzvláště používáno pro práci v *in-vitro* podmínkách s okrasnými rostlinami. Nadále byla již ověřena její úspěšnost u předchozích pokusech či výzkumech u explantátových kultur *Phlox paniculata* jak se zmiňují práce Declercka a Korban (1995) a Matiska (2009)

Pro první fázi kultivace explantátů listových segmentů, které byly odebírány z rostlin uchovávaných ve sklenicích bylo používáno klasické MS (Murashige a Skoog médium), které bylo obohaceno o regulatory rostlinného růstu TDZ o koncentraci $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ IAA pro podporu tvorby a růstu kalusů.

Následná kultivace odebíraných prýtů ze vzrostlých kalusů byla zasazována do standartního MS média bez dlaších přísad rostlinných hormonů. Takto bylo zacházeno nadále i během pasážování, kdy stonkové řízky byly zasazovány do stejného média.

4.2.1 Příprava média

Pro nejsnadnější přípravu vytvoření MS média, se používají zásobní roztoky, které jsou předem připravené v 1000 ml erlenmayerově baňce, které jsou skladované ve tmě a v chladu, dále používáme destilovanou vodu a samostatně navažované složky. Pro přípravu média se používá různé množství těchto látek, avšak pro přípravu MS média, které bylo využíváno v této práci bylo použito uvedené množství v následující tabulce.

Pro přípravu 1 litru MS média se nejdříve odměří zásobní roztoky do 1000 ml odměrné baňky, odměřování se provádí pipetováním a před použitím pro pipetování dalšího roztoku, vždy pipetu důkladně promyjeme destilovanou vodou, aby nedocházelo k ředění zásobních roztoků. Následně se odváží na laboratorních váhách sacharóza, agar a myo-inositol. Před smícháním navážených složek bylo nejprve důležité dané složky v kádinkách předem převést do formy roztoku a to smícháním s destilovanou vodou. V případě agaru převádíme ve formě suspenze. Během této práce se nejčastěji používal technický agar ve formě prášku, ovšem při přípravě několika litrů média byl používán i agar ve formě nerozdrceného prášku a to stříhaný na drobné pásy, tato forma agaru se musela předem před převedením do odměrné baňky zahřát na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tak, aby byl schopen vytvořit emulzi. Po přidání kapalných a pevných složek ve formě roztoku do odměrné baňky, dolejeme po rysku odměrné baňky destilovanou vodou. Pokud má médium obsahovat růstové rostlinné regulatory, je nutné je přidat ještě před úpravou pH také ve formě roztoků. Následně přelejeme celý roztok do vhodné kádinky nebo erlenmayerovy baňky pro snazší změření

a úpravu pH roztoku na optimální hodnotu. Optimální hodnota pH roztoku je deklarována na 5,7 až 5,8. Pro úpravu pH používáme 1 M roztok hydroxidu draselného a to pro zvyšování pH, pro snižování pH byl připraven 1 M roztok kyseliny citrónové, během mého pokusu jsem však nemusel tuto variantu použít.

Pro další použití roztoku upravíme roztok rozvařením v mikrovlnné troubě po dobu zhruba 10 – 15 min (tato doba je orientační pro rozvaření 1000 ml roztoku) a při výkonu 800 W do dokonalého rozpuštění všech složek. Následný postup pro přípravu média záleží na formě použití, pokud hodláme rozlévat médium do petriho misek, tak se roztok předem sterilizuje v autoklávu po dobu 15 - 20 minut při teplotě 121 °C a při tlaku 100 kPa.

Následně po mírném ochlazení se roztok rozléva do petriho misek ve sterilním prostředí aseptického boxu (flow-box) a zabalí do průtažné PE fólie (potravinářská fólie), která nám snižuje pravděpodobnost kontaminování médií. Poté petriho misky přepravíme do chladu a temna. Pro přípravu MS média v erlenmayerových baňkách je třeba nejprve rozvařené médium rozlít do připravených baněk. Erlenmayerovy baňky poté překryjeme a uzavřeme aluminiovou fólií. Následně můžeme erlenmayerovy baňky sterilizovat při podmínkách výše uvedených.

Tab. 1 Příprava MS média

ZÁSOBNÍ ROZTOK A	NAVÁŽKA NA 1 l
HN_4NO_3	16,5 g
KNO_3	19,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,7 g
KH_2PO_4	1,7 g
ZÁSOBNÍ ROZTOK B:	NAVÁŽKA NA 1 l
H_3BO_3	0,62 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (H_2O)	2,23 g (1,69 g)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (7 H_2O)	0,86 g (1,06 g)
ZÁSOBNÍ ROZTOK C:	NAVÁŽKA NA 1 l
KJ	0,083 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g

ZÁSOBNÍ ROZTOK D:	NAVÁŽKA NA 1 l
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0025 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0025 g
ZÁSOBNÍ ROZTOK E:	NAVÁŽKA NA 1 l
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	3,73 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78 g
ZÁSOBNÍ ROZTOK V:	NAVÁŽKA NA 1 l
Kyselina nikotinová	0,05 g
Pyridoxine	0,05 g
Thiamin	0,01 g
glycin	0,20 g
PŘÍMÁ NAVÁŽKA	NAVÁŽKA NA 1 l
Sacharoza	30,0 g
Agar	8,0 g
Myo-inositol	0,1 g
NA 1 l MÉDIA NAPIPETOVAT:	100 ml A
	10 ml B
	10 ml C
	10 ml D
	10 ml E
	10 ml V
pH upravit na 5,7 – 5,8	

4.2.2 Použité varianty

Pro pokus a tvorbu kalusu z listových segmentů byla zkoušena varianta rostlinných růstových regulátorů a to thidiazuron. (uváděno na 1 l média)

TDZ 1,5 mg + 0,5 mg IAA

4.3 Odběr explantátů, následné ošetření

Odrůdy, testované rostliny *Phlox paniculata* byly získány pro pokus z botanické zahrady hlavního města Prahy. Byly obdrženy na jaře v mírně narostlém stádiu a byly okamžitě umístěny do areálů skleníků České zemědělské univerzity. Ve skleníku byly kultivovány pro požadovanou velikost rostliny pro odběr explantátu, zároveň umístěním do skleníků bylo sníženo riziko kontaminace rostlin patogeny nebo škůdci z vnějšího prostředí. Ve skleníku rostliny byly udržovány v optimálních podmínkách a probíhala zde pravidelná kontrola zasažení háďátky a ostatními škůci (bodavě savý hmyz) a snahou potlačit jejich výskyt. Po dosažení optimální velikosti rostlin, zhruba 15 - 20 cm byly rostliny připraveny pro následný odběr explantátů. Kvůli zasažení rostlin háďátkami bylo nutno odebírat explantáty i z nevzrostlých rostlin, určité odrůdy rostlin trpěly obzvlášť zakrslým vzrůstem. Z odrůdy 'Laura' nebylo možno odebrat vzorky z důvodů nedostatečné tvorby listové plochy a brzkého úhynu rostliny. Po prvním odběru následoval odběr druhý, který byl v rozmezí 2 - 3 týdnů. Explantáty z rostliny byly získávány z listových segmentů odebraných z horní části rostlin (přibližně vrchní třetina rostliny). Listové segmenty byly vybírány dle listových deformací, které vykazovaly poškození háďátkami a listy zakrslého vzrůstu či jinak deformované. Listové plochy byly většinou z explantátů dospělých, několikrát bylo třeba odebrat vzorky i z mladých listů a to z nedostatku ostatní listové plochy rostlin. Rozdíly mezi výsledky dospělých a mladých listů však nebyl zkoumán. Pro správnou manipulaci s rostlinnými explantáty a pro čistou a nekontaminovanou kulturu a práci je třeba však nejdříve odebrané listové segmenty desinfikovat. Pro optimální desinfikaci s co nejmenším poškozením pletiv bylo třeba nejdříve experimentálně zjistit optimální koncentraci desinfekčního činidla. Ze zkušeností předchozích pokusů *in-vitro* kultur *Phlox paniculata* byl zvolen vodný roztok desinfekčního činidla chlornanu sodného (NaClO) – (komerčně znám jako desinfekční přípravek SAVO 4,7 % NaClO). Dále bylo použito pro vyšší efektivitu desinfekčního prostředku pár kapek smáčedla. Neoptimálnější koncentrace roztoku sava byla stanovena při 20 ml na 80 ml destilované vody. Pokusné listové segmenty byly vystaveny této koncentraci roztoku po dobu 10 minut a po omytí destilovanou vodou nejevily významně viditelné poškození pletiv. Mladší listy ovšem jevily větší poškození pletiv než při pokusech s listy plně vyžralými. Následná příprava explantátů probíhala následovně, listové segmenty byly odebírány a uzavírány do uzavíratelných sklenic, ve kterých byli následovně desinfikováni. V laboratoři byly listy postupně vyjímány ze sklenic a byli máčeni ve vodní lázni a poté pod proudem vody očištěni od hrubých nečistot. Následně do sklenic byl vlit

vodný roztok desinfekčního činidla společně s pár kapkami smáčedla a vloženy listy. V této sklenici byly vystaveny desinfekčnímu činidlu po dobu 10 minut, průběžně byly sklenice ještě protřepávány pro plné pokrytí desinfekcí plochy listů. Po 10 minutách byl vodný roztok slit ve sterilním prostředí flowboxu, do sklenice byla vlita destilovaná voda pro odstranění zbytků desinfekčního činidla. Se sklenicí jsme vždy po chvíli zatřepaly, aby se dokonale odstranily zbytky desinfekce. Toto promývání destilovanou vodou jsme opakovali 3 x po dobu 15 minut. Po třetím promytí destilovanou vodou jsou listy připraveny pro další zpracování. Listům je v prostředí flowboxu pomocí sterilního skalpelu zbavená středová žilka, okraje listů či případně poškozené části pletiv způsobené desinfekcí. Následně jsou listové segmenty rozřezány na stejně velké části, velikost segmentů kolísala z důvodů rozdílných velikostí listů, velikost byla zhruba 0,5 - 1 x 0,5 - 1 cm.

4.4 Testování rostliných kultur na výskyt háďátek

Před samotným založením *in-vitro* kultur je třeba nejdříve otestovat výskyt háďátek v rostlinách ze kterých budeme odebírat vzorky pro tuto práci. Testování na výskyt háďátek budeme provádět i během pokusů a to testováním kalusů vytvořených z odebraných listových segmentů a také ve finální fázi práce, kdy budeme zkoumat samotné rostliny, které nám vzešly z pokusu. Prvotní výběr rostlin, které byly vybírány pro naši práci a také pro testování na háďátka byla dle periodicity výskytu háďátek v dané lokalitě a jejich škodám způsobovaných pravidelně na daných odrůdách *Phlox paniculata*. Po vytipování rostlin, byly vybírány pomocí vizuálního dojmu a vzhledu rostlin. Zaměřovali jsme se na rostliny, které byly obzvláště zakrslého vzrůstu, jejich listové plochy byly menší a kolikrát zakrouceny, nadále na rostlinách se vyskytovali různé foliální deformace. Nadále můžeme pozorovat nažloutlé změny barev listů a velmi malou či žádnou násadku květů (v našem případě jsme tento jev pozorovat nemohli neboť jsme odebírali vzorky z rostlin, které nebyly v období květu). Po prozkoumání rostlin běžnými příznaky, jsme vytypovali dané rostliny a odebrali z nich vzorky na testování. Pro otestování vzorků jsme použili Baermanovu metodu. Vzorky byly odebírány jak foliální tak i stonkové, dále jsme k testování výchozích rostlin používali také již odumřelé části rostlin. V laboratorním prostředí jsme si následně připravili Baermanovu nálevku na stojanu, která má ve vyústění nálevky gumovou hadičku uzavřenou svorkou. Odebrané vzorky upravíme nakrájením či nadrcením na drobné částice a uložíme do vrstvy papírového kapesník papíru a uložíme je do nálevky. Následně celý obsah zalejeme destilovanou vodou. Aktivní hlístice migrují přes porézní papír nebo látku do vody a následně

klesají na dno do gumové hadičky. Takto vzorek ponecháme několik hodin, nejlépe přes noc. Drtivou většinu hád'átek získáme z prvních odebraných 5 ml roztoku. Poté umístíme hlístice do mělkých misek, ze kterých můžeme snadno mikroskopovat, pro snížení aktivity hád'átek přejedeme párkrát pod mikroskopovacím sklíčkem plamenem zapalovače, čímž snížíme jejich aktivitu ale přitom je nezabijeme. Následně je můžeme mikroskopovat a případně preparační jehlou si vybrat pár jedinců pro fotografii. Tímto procesem otestujeme jak počáteční matečnou rostlinu, tak následně kalusy vytvořené z listových segmentů matečné rostliny a ve finále konečnou rostlinu.

4.5 Založení pokusu a jeho průběh

Po odběru listových segmentů a jejich následné desinfekce, se listové segmenty přenášely na petriho misky (průměr 90 mm, odhadovaný objem 5 ml), ve kterém bylo MS médium obohacené o TDZ a IAA. Veškeré postupy byly prováděny v aseptickém boxu (flow box), veškeré nástroje a skla byla sterilizována v autoklávu a následně desinfikována v ethanolu a nad plamenem lihového kahanu. Odebírané listové vzorky byly desinfikovány ve 20% roztoku SAVA (4,7 % NaOCl).

4.5.1 Kultivace kalusů

Následně byly listové vzorky ve sterilním prostředí upraveny skalpelem a umístěny na petriho misky (průměr 90 mm, odhadovaný objem 5 ml) ve kterých bylo MS médium obohacené o $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ a $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ IAA, které urychluje tvorbu kalusu. Listové segmenty byly pokládány na petriho misky po 5 kusech. Důležité je, při umístění segmentů dodržovat polaritu původního listu. Po položení segmentu na médium je lehce přitlačíme, aby plocha segmentu byla v co největším kontaktu s médiem. Po uložení posledního, páteho segmentu petriho misku uzavřeme a pomocí pásky z PE fólie petriho misku 3x obtočíme z důvodů zabránění kontaminace. Nakonec petriho misku popíšeme lihovým fixem (datum, odrůda, médium) a uskladníme. Listové segmenty v petriho miskách se usklaňovaly v kontrolovaných kultivačních podmínkách a to v inkubátoru s teplotou $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ během denní fáze a s teplotou $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ během noční fáze. V inkubátoru byla nastavena fotoperioda o 16 hodinách světla a 8 hodin tmy. Do petriho misek byly odebrány vzorky o dvou opakování a pro každou odrůdu byli odebrány vzorky podle množství listových ploch na matečné kultuře. V prvním odběru byly odebrány listové segmenty těchto odrůd 'Aňa Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen', 'Molodost', 'Mies Copijn', 'Igor Talkov', 'Winsdor', 'Jubilee', 'Sekret'. Odrůdu 'Laura' nebylo možné odebrat z důvodu zahynutí rostliny před odběrem. Po prvním odběru se celý process opakoval v časovém rozmezí přibližně 3 - 4

týdny. V tomto odběru nebylo možno již získat některé odrůdy 'Laura' a 'Sekret' neboť do doby druhého odběru již rostliny nebyly v odběru schopném stavu díky pokročilému stavu infekce hád'átkami.

Zhruba po 5 týdnech kultivace listových segmentů v petriho miskách, jsme začaly přenášet narostlé kalusy s mírně narostlými prýty do erlenmayerových baněk (o objemu 100 ml) a pro nedostatečné množství bylo nutno použít také zavařovací sklenice (o objemu 200 ml). V erlenmayerové baňce a zavařovací sklenici bylo shodně 25 ml MS média. Pokud v petriho misce byly dostatečně regenerované kalusy, byly přenášeny po třech do erlenmayerovy baňky. Obecně byly vybírány kalusy které vizuálně vykazovaly nejvíce vitální vzrůst a regeneraci. Pokud nastal stav, kdy se přenášely všechny kalusy z petriho misky tak byly přeneseny v poměru 3 kalusy a 2 kalusy zvlášť. Ke zbylým dvěma kalusům se nepřenášely další, neboť by se tím zvyšovalo riziko přenosu hád'átek z infikovaných kalusů na kalusy zdravé. Během této fáze probíhalo také druhé testování na přítomnost hád'átek. Nadále přenesené kalusy ve sklenicích byly rozděleny v poměru 50:50. Jedna část se nadále kultivovala ve stejných kontrolovaných podmínkách kultivačního boxu a druhá část byla přestěhována do stojanu se zářivkami. Kultivace ve stojanu probíhala při konstantních světelných podmínkách a bez možnosti regulace teploty.

4.5.2 Pasážování prýtů

Po 3 týdnech kultivace prýtů na kalusech se začaly narostlé prýty množit pasážováním a přenášet do erlenmayerových baněk o obsahu 25 ml MS média. Vzniklé sklenice se prýty byly přeneseny do stojanu se zářivkami a byly již všechny kultivovány při konstantních světelných podmínkách a bez regulace teploty.

4.5.3 Zakořeňování a přenos do substrátu

Během této fáze, jsme začali přenášet zakořeňené prýty do nesterilního prostředí. Nadále zde bylo prověřeno poslední testování na výskyt hád'átek. Rostliny se přenášely do minipařenišť o rozměru 47 x 20 x 20,5 cm, jednotlivé pařeniště mají regulovatelnou ventilaci. Jednotlivé zakořeňené rostliny po odebrání vzorku na testování výskytu hád'átek, se pořádně propraly pod tekoucí vodou, byly odstraněny zbytky kultivačního média a případné zbytky kalusů. Zakořeňené prýty se přenášely do množárenského substrátu, vylehčeného perlitem (substrát pro výsev a množení : perlit = 3 : 1) . Substrát byl mírně navlhčen a částečně sterilizován v mikrovlné troubě (800 W po dobu 5 min). Po ochlazení byl substrát převáděn do minisadbovačů o rozměrech buňky 2,5 x 2,5 cm. Minipařeniště muselo být

předem upraveno, aby se zamezila kontaminace zdravých vzorků, byly v něm vytvořeny přepážky, které oddělovaly 3 buňky. Do těchto buněk byly vloženy prýty s kořeny, nebo náznaky rostoucích kořenů, které byly ve stejné erlenmayerovy baňce. Z důvodů neúplné sterilizace substrátu, je třeba po převodu aplikovat fungicidní prostředek. V našem případě byl použit Previcur 0,15 %.

4.6 Vyhodnocování výsledků

Veškeré výsledky byly vyhodnocovány na základě aritmetického průměru a následných převodů do procent.

5 Výsledky

5.1 Výsledky jednotlivých postupů

5.1.1 Desinfekce listových vzorků

Během testování optimálního desinfekčního prostředku pro sterilizaci listů, které mají být použity pro následné pokusy s háďátkami, byl testován produkt SAVO (chlornan sodný). Neoptimálnější varianta vyšla na použití 20 % roztoku SAVA s destilovanou vodou se třema kapkami smáčedla. Následná desinfekce listů probíhala po dobu 10 minut. Listy po desinfekci nejevily přílišné známky poškození pletiv. Při pokusu s delší dobou desinfekce a to po dobu 15 minut listová pletiva jevila viditelné známky poškození. Tento pokus nebyl více detailně vyhodnocován.

5.1.2 Odběr a regenerace kalusů

V této části pokusu jsem zkoumal schopnost regenerace listových explantátů, které byli desinfikovány ve 20 % vodném roztoku SAVA a kultivovány na TDZ 1,5 mg . l⁻¹ a 0,5 mg . l⁻¹ IAA. U této části pokusu byla úspěšnost okolo 100%. Úspěšnost byla snížena kontaminací vzorků plísněmi, které pravděpodobně kontaminovaly vzorky při neodborné manipulaci vzorky ve flowboxu. Nejúspěšněji regenerovala odrůda Winsdor a Molodost. Případné vzorky, které se neregenovali byli patrně příliš poškozené během sterilizace v roztoku SAVA. U odběru č.2 byla účinnost nižší a to především z důvodů vyšší kontaminace vzorků bakteriálními kontaminacemi.

Tab. 2 Regenerace kalusů 1. odběr

<i>Odrůda</i>	<i>Odebraných explantátů</i>	<i>Kontaminace</i>	<i>Regenerované kalusy</i>	<i>Úspěšnost regenerace %</i>
'Aňa Gaganova'	35	5	30	100,0
'Blue Paradise'	35	5	30	100,0
'Errötense Mädchen'	25	5	20	100,0
'Molodost'	30	0	30	100,0
'Mies Copijn'	30	0	26	86,7
Igor Talkov'	35	5	29	96,7
'Winsdor'	30	0	30	100,0
'Jubilee'	25	5	17	85,0
'Sekret'	30	30	0	-

Tab. 3 Regenerace kalusů 2. odběr

<i>Odrůda</i>	<i>Odebraných explantátů</i>	<i>Kontaminace</i>	<i>Regenerované kalusy</i>	<i>Úspěšnost regenerace %</i>
'Aňa Gaganova'	30	5	25	100,0
'Blue paradise'	35	10	25	100,0
'Errötense Mädchen'	30	5	18	72,0
'Molodost'	25	5	20	100,0
'Mies Copijn'	25	0	18	72,0
Igor Talkov'	20	0	8	40,0
'Windsor'	20	5	12	80,0
'Jubilee'	20	0	13	65,0

5.1.3 Regenerace prýtlů

Během pokusu ozdravování, bylo také nahlíženo na regeneraci prýtlů z jednotlivých kalusů, které byly kultivovány dále na MS médium. Odrůda 'Errötense Mädchen' předvedla nejvyšší regeneraci prýtlů, kdy průměrně na jeden kalus se vytvářela 2,53 prýtlů schopných převedení na MS médium. Odrůda 'Blue Paradise' vytvářela také vysoké množství životaschopných prýtlů, průměrné množství prýtlů bylo 2,29 na kalus, vytvářel také vysoké množství prýtlů, které však nebyly možno převést na MS médium. Tvorba životaschopných prýtlů v průměru na kalus vyšších jak 2 měla už jen odrůda 'Aňa Gaganova'. Nejnížší tvorbu prýtlů z kalusů projevila odrůda 'Igor Talkov', zde regenerace kalusu byla vysoká, ovšem prýty, které se tvořily byly velmi drobné a při převodu na MS médium většinou uhynuly. Velmi podobně se na tom byly odrůdy 'Jubilee' a 'Molodost'. Kalusy, které byly v regulovaných podmínkách regenerovaly prýty v průměru o 0,33 (prýtlů na kalus) více jak v podmínkách neregulovaných.

Tab. 4 Regenerace prýtů v regulovaných podmínkách

<i>Odrůda</i>	<i>Regenerace prýtu z kalusů</i>		
	Regulované podmínky		
	počet kalusů	počet prýtů	prýtů na kalus
'Aňa Gaganova'	21	43	2,05 ± 0,52
'Blue Paradise'	21	48	2,29 ± 0,77
'Errötense Mädchen'	15	38	2,53 ± 0,78
'Molodost'	18	17	0,94 ± 0,61
'Mies Copijn'	21	46	2,19 ± 0,54
'Igor Talkov'	15	13	0,87 ± 0,38
'Winsdor'	15	26	1,73 ± 0,46
'Jubilee'	18	20	1,11 ± 0,54

Tab. 5 Tvorba prýtů v neregulovaných podmínkách

<i>Odrůda</i>	<i>Regenerace prýtu z kalusů</i>		
	Neregulované podmínky		
	počet kalusu	počet prýtů	prýtů na kalus
'Aňa Gaganova'	21	38	1,81 ± 0,66
'Blue Paradise'	24	40	1,67 ± 0,93
'Errötense Mädchen'	15	33	2,20 ± 0,60
'Molodost'	21	12	0,57 ± 0,56
'Mies Copijn'	21	40	1,90 ± 0,59
'Igor Talkov'	15	5	0,33 ± 0,38
'Winsdor'	12	20	1,67 ± 0,42
'Jubilee'	15	13	0,87 ± 0,69

**Obr. 11** Regenerace prýtů z kalusů odrůda 'Blue Paradise'**Obr. 13** Regenerace prýtů z kalusů odrůda 'Errötense Mädchen'



Obr. 15 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Winsdor'



Obr. 16 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Jubilee'



Obr. 12 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Molodost'



Obr. 17 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Aňa Gaganova'



Obr. 14 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Igor Talkov'



Obr. 18 Regenerace prýtlů z kalusů odrůda 'Mies Copijn'

5.1.4 Převod do substrátu

Pasážované prýtlky, které byly již zregenerovány se převáděly do substrátu, převáděly se s již vytvořenými kořeny, či jejich náznaky. Převáděly se také prýtlky, které ještě založené kořeny neměly. Každý převáděný vzorek byl testován na přítomnost háráték. Vyhodnocování

ujmutí a přežití jednotlivých převedených vzorků nebylo možno vyhodnocovat z nedostatku uplynulé doby po převedení do substrátu. Nebyly by získány relevantní výsledky.



Obr. 19 Upravené minipařeniště pro eliminaci háďátek



Obr. 20 Převedené rostliny do substrátu

5.2 Testování na přítomnost háďátek

Během tohoto pokusu byly testovány rostliny ze kterých byly odebírány vzorky na přítomnost háďátek v rostlinách. Během testování byla nalezena háďátka ve všech vzorcích kromě odrůdy 'Jubilee' ve kterém nebyl nalezen škůdce. Při testování kalusů, které vznikly z odběru listových segmentů infikovaných rostlin byla pravděpodobnost nalezení háďátek od 18 % do 46%, pravděpodobnost výskytu háďátek bude tedy také závislá na odrůdě. K testování byly vybírány vzorky, jenž tvořily regenerované kalusy s vysokou produkcí prýtlů tak i kalusy, které netvořily prýtlů, nebo regenerovaly malé množství prýtlů. Během testování finálních rostlin získaných z listových explantátů infikovaných rostlin, nebyl nalezen žádný výskyt háďátek. Testování probíhalo Baermanovou metodou a následným mikroskopováním při zvětšení 40x. Testován byl veškerý materiál, který se převáděl do *ex-vitro* kultur.

Tab. 6 Testování rostlin před odebráním segmentů na výskyt háďátek

<i>Odrůda</i>	<i>Počet</i>			<i>%</i>
	testovaných vzorku	negativní	pozitivní	
'Aňa Gaganova'	1	0	1	100
'Blue Paradise'	1	0	1	100
'Errötense Mädchen'	1	0	1	100
'Molodost'	1	0	1	100
'Mies Copijn'	1	0	1	100
Igor Talkov'	1	0	1	100
'Winsdor'	1	0	1	100
'Jubilee'	1	1	0	0

Tab. 6 Testování regenerovaných kalusů na výskyt háďátek

<i>Odrůda</i>	<i>Počet</i>			<i>%</i>
	testovaných vzorku	negativní	pozitivní	
'Aňa Gaganova'	11	8	3	27,27
'Blue Paradise'	17	12	5	29,41
'Errötense Mädchen'	11	9	2	18,18
'Molodost'	11	6	5	45,45
'Mies Copijn'	13	6	6	46,15
Igor Talkov'	15	11	4	26,67
'Winsdor'	8	6	2	25,00

Tab. 7 Testování převáděných rostlin z invitro na výskyt háďátek

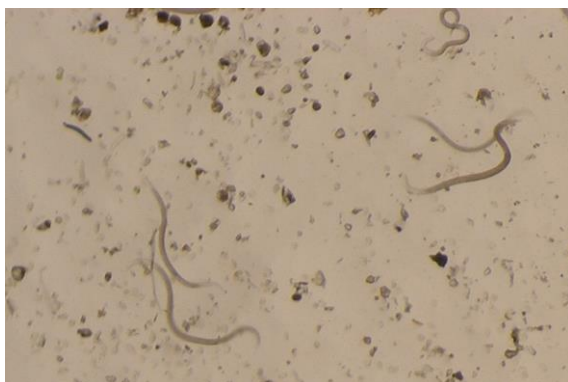
<i>Odrůda</i>	<i>Počet</i>			<i>%</i>
	testovaných vzorku	negativní	pozitivní	
'Aňa Gaganova'	12	12	0	0,00
'Blue Paradise'	13	13	0	0,00
'Errötense Mädchen'	8	8	0	0,00
'Mies Copijn'	16	16	0	0,00
'Winsdor'	11	11	0	0,00



Obr. 21 Výskyt háďátek v odrůdě 'Aňa Gaganova' (zvětšeno 40x)



Obr. 22 Výskyt háďátek v odrůdě 'Molodost' (zvětšeno 40x)



Obr. 23 Výskyt háďátek v odrůdě 'Errötense Mädchen' (zvětšeno 40x)



Obr. 24 Výskyt háďátek v odrůdě 'Mies Copijn' (zvětšeno 40x)



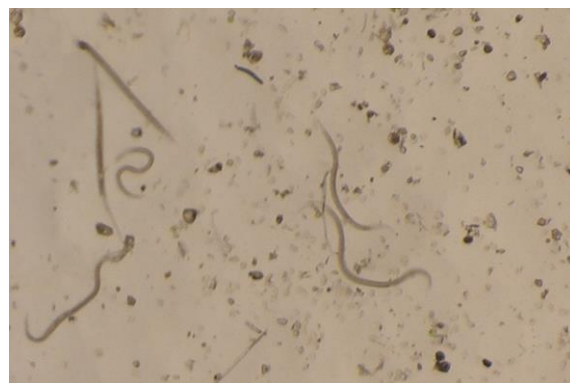
Obr. 25 Výskyt háďátek v odrůdě 'Blue Paradise' (zvětšeno 40x)



Obr. 26 Výskyt háďátek v odrůdě 'Jubilee' (zvětšeno 40x)



Obr. 27 Výskyt háďátek v odrůdě 'Igor Talkov' (zvětšeno 40x)



Obr. 28 Výskyt háďátek v odrůdě 'Winsdor' (zvětšeno 40x)



Obr. 29 Detail háďátka, přední části. Viditelný stilet (zvětšeno 100x)



Obr. 30 Detail háďátka, zadní část. (zvětšeno 100x)

6 Diskuze

Desinfekce explantátů

Explantáty se desinfikovaly ve vodném roztoku přípravku SAVO s několika kapkami smáčedla. Přípravek SAVO obsahuje 4,7 % NaClO. Ve výsledku jsme tedy desinfikovali explantáty ve vodném roztoku o koncentraci 0,94 % NaClO. Tato koncentrace se shoduje s výsledky a horní hranicí NaClO používané při experimentech Matiskou (2009) s kulturami *Phlox paniculata*. Nadále se shoduje také doba 20 minut po kterou se explantáty máčejí s horní hranicí doporučeného působení, kterou publikuje Matiska (2009). Doporučená hodnota je 0,5 – 1 % NaClO po dobu 10 – 20 minut. Při delší době docházelo k poškozování pletiv i za použití nižších koncentrací NaClO. Dále zmiňuje fakt, že listy odebírané z venkovních podmínek nebylo možné sterilizovat ani při 1 % NaClO po dobu 30 min. Proto doporučuje kultivaci rostlin v prostředí skleníku alespoň po dobu 3 měsíců.

Fraga et al. (2004) uvádí pro povrchovou desinfikaci listů *Phlox paniculata* máčení v roztoku 3,5 % NaClO společně s 0,5 % detergentem Tween 20 (Sigma) po dobu 15 – 20 minut s následnými 3 – 5 vypláchnutím v destilované a sterilizované vodě. Nicméně při takto vysoké koncentraci NaClO a při době 15 - 20 min se jeví tato koncentrace příliš vysoká a pravděpodobně by docházelo k vyššímu poškození pletiv a neschopnost regenerace explantátů.

Declerck a Korban (1995) použili pro desinfekci listových explantátů *Phlox paniculata* 0,43 % NaClO s 1 % detergentem Tween 20 po dobu 10 minut. Tato varianta se zdá nedostatečně účinná z důvodů nízké koncentrace, která odpovídá 10 % roztoku SAVO.

Jain et al. (2002) při pokusech s *Phlox paniculata* používala detergent Teepol o koncentraci 1 % s následným máčením v chloridu rtuťnatém (0,1 %, 15 min).

Složení médií

Podle nalezených prací studující *in-vitro* kultury explantátů *Phlox paniculata* (Declerck a Korban, 1995; Fraga et al., 2004; Jain et al., 2002; Matiska, 2009) bylo shledáno MS médium vhodné jakožto základní živná půda pro explantáty. Ve výše zmiňovaných pracích se liší použití sacharidu a jeho koncentrace. Declerck and Korban (1995), Jain et al. (2004) a Matiska (2009) doporučují použít sacharid sacharóza, jednotlivé práce se však liší v koncentracích, kdy Declerck a Korban (1995) použili 2% koncentraci sacharózy, zatímco Jain et al. (2004) a Matiska (2009) doporučují 3% koncentraci. Tato varianta se v pokusu jevila jako dostatečná. Fraga et al. (2004) použili při sestavování média sacharid glukózu o koncentraci 2%. Z důvodu použití jiného sacharidu, není zde přítomné srovnání.

RRR, které byly použity pro regeneraci listových explantátů a iniciaci tvorby kalusů a prýtů vycházely primárně z poznatků práce Matisky (2009) a Declerck a Korban (1995). Pro pokusy prováděné Matiskou (2009) byly použity rozdílné odrůdy *Phlox paniculata* 'Fujiyama', 'Starfire' a 'Rijnstroom'. Zatímco Declerck and Korban (1995) používali odrůdy 'Franz Schubert' a 'Prospero'. Problematika reakce odrůd *Phlox paniculata* na jednotlivé RRR v médiu je v odborné praxi známa, což také potvrzují získané informace z výše uvedených prací Matisky (2009) a Declerck a Korban (1995).

Declerck a Korban (1995) použili pro iniciaci tvorby kalusu a prýtů BA s auxinem IAA a mimo jiné i různé koncentrace TDZ s IAA (koncentrací TDZ 0,25 mg, 1 mg, 3 mg a 5 mg dohromady s koncentracemi IAA 0 mg, 0,5 mg a 1 mg na litr média). Kdy při nižších koncentracích TDZ vykazují lepší regeneraci kalusu oproti BAP a také tvorbu prýtů. Jain et al. (2004) použili při iniciaci růstu kalusu NAA, Matiska (2009) však srovnává, že lepší uplatnění má IAA, které vhodně doplňuje cytokinin TDZ a výrazně zvyšoval počet prorůstajících výhonů, kdy při koncentraci 1,5 mg TDZ a 0,5 mg IAA byla 100 % regenerace kalusů a explantátů s výhony kdy dosáhl regeneraci počtu vyhonů $4,4 \pm 2,3$ u odrůdy 'Fujiyama'. Což potvrzují výsledky v pokusu kdy odrůdy 'Aňa Gaganova', 'Blue Paradise', 'Errötense Mädchen' a 'Molodost' při prvním odběru dosahovali 100 % regenerace kalusu. U ostatních odrůd byla regenerace téměř 100%. Při druhém odběru byla úspěšnost již nižší avšak výše zmíněné odrůdy prokazovali nadále 100% regeneraci a také nejvyšší tvorbu prýtů. V pokusu však byly počítány vzrostlé prýty, které se převáděly nadále do MS médii. Proto jsou výsledky regenerace prýtů nižší než u prací Matisky (2009) a Declerck and Korban (1995). Nejúspěšněji regeneroval 'Errötense Mädchen' s hodnotami $2,53 \pm 0,78$, 'Blue Paradise' $2,29 \pm 0,77$ a 'Mies Copijn' $2,19 \pm 0,54$. Za zmínku stojí odrůda 'Igor Talkov', která tvořila nejméně prýtů $0,87 \pm 0,38$. Dané odrůdy nelze porovnat s výsledky Matisky (2009) a Declerck and Korban (1995) z důvodů použití odlišných odrůd. Je zde také patrný rozdíl při kultivaci v regulovaných podmínkách kdy tvořili kalusy v průměru o 0,33 výhonů na kalus oproti neregulovaným podmínkám. Patrně také je zde možná souvislost s regenerací prýtů

Výskyt háďátek

Nejbližší možný nalezený pokus ozdravování prováděný na rostlinách *Phlox* infikovaných háďátkem *Ditylenchus dipsaticus* byla práce LaMondia (1999). Kdy pro redukcí stavu *Ditylenchus dipsaticus* používal insekticidy Abamectin při koncentracích 0,005 mg a.i./l a 0,011 a.i./l a také insekticid Diazinon při koncentracích 0,62 nebo 1,87 mg a.i./l. Prokazatelnou redukcí stavu populace *Ditylenchus dipsaticus* snížil prostředek Diazinon ovšem ani po 6té aplikaci prostředku nebyl stav háďátek plně eliminován.

Teorie o eliminaci hád'átek v *Phlox paniculata* pochází ze zkušeností a praxe Ing. Matisky, Ph.D. Testování na výskyt *Ditylenchus dipsaci* zmiňuje ve své práci LaMondia (1999) kdy extrahuje hád'átka z listových ploch v třepačce po dobu 24 hod a poté jsou filtrovány. Zouhar a Douda (2007) doporučuje použití modifikované Baermannovy extrační techniky, kdy nadrcená listová plocha se vloží do baermanovy nálevky ve vrstvě papírového kapesníčku, zaleje se vodou a nechá extrahovat minimálně 10 hodin. Poté se odebere vodný roztok (5 – 10 ml) ze spodní části nálevky a pod mikroskopem pozorujeme stav hád'átek. Tato metoda byla použita i v této práci na testování všech vzorků od matečné rostliny, kalusů po finální rostliny převáděné do *ex-vitro* podmínek.

Při provádění pokusů vyšlo najevo, že výskyt *Ditylenchus dipsaci* ve testovaných vzorcích kalusů klesl, počítány byly infikované kalusy, nebyla zkoumána velikost populace v infikovaných kalusech. Z matečnic, které byly infikované byly odebrány listové segmenty a umístěny na MS médium s RRR (1,5 mg TDZ a 0,5 mg IAA). Infikování kalusů bylo odlišné podle kultivarů, nejvyšší redukci hád'átek se projevila u odrůdy 'Errötense Mädchen' kdy bylo infikováno 18,18 % kalusů. Průměrná hodnota infikovaných kalusů poté byla 31,16 %. Zouhar a Douda (2007) používají pro kultivaci hád'átek na kalusech MS médium při 2 % sacharózy a fytohormony 0,5 mg 2,4-D a 0,25 mg BAP. Je zde možné tedy, že RRR TDZ a IAA znemožňují nebo redukuje pohyb *Ditylenchus dipsaci* mezi listovým explantátem a kalusovou strukturou. Zouhar a Douda (2007) také zmiňují, že inokulace *Ditylenchus dipsaci* nebyla prováděna z listových segmentů vložených na kultivační médium, ale použitím modifikované Baermannovy extrační techniky a následnou inokulací na již vytvořené kalusové struktury. Za zmínku také stojí, že na inokulovaných kalusech lze pozorovat odumírání napadených pletiv, která poté tmavnou. Případnou selekci je možné eliminovat napadené kalusy a pěstovat ozdravené kultury *Phlox paniculata*.

Následným testováním vzorků jenž byly převáděny do *ex-vitro* podmínek bylo prokázána 100 % eliminace hád'átek.

7 Závěr

Bylo potvrzeno, že reakce listových segmentů jednotlivých odrůd *Phlox paniculata* je na kultivační médiu TDZ o koncentraci $1,5 \mu\text{g. l}^{-1}$ a IAA $0,5 \mu\text{g. l}^{-1}$ je rozlišná.

Ukázalo se, že rozdílné podmínky pro regeneraci prýtlů z kultivovaných kalusů hrají podstatnou roli. Regulované podmínky, kdy je dodržovaná fotoperioda a stálá teplota mají pozitivní vliv na prorůstání prýtlů z kalusových struktur.

Bylo prokázáno, že lze úspěšně eliminovat háďátka *Ditylenchus dipsaci* z kultur *Phlox paniculata* pomocí kultur *in-vitro*.

Jelikož se tato metoda projevuje jako 100 % je možné tuto metodu používat na ozdravování napadených kultur *Phlox* spp.. Tato metoda je však poměrně nákladná z důvodů, vstupních nákladů na pořízení a vybavení laboratoře pro explantátové kultury.

8 Seznam literatury

- [1] Armitage, A. M. 2008. *Herbaceous Perennial Plants: A Treatise on Their Identification, Culture and Garden Attributes*. Stipes Pub Llc. p. 1109. ISBN: 1588747751
- [2] Agrios, G. 1936. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. San Diego. 886 s. ISBN: 120445654
- [3] Böhm, Č. 1991. *Trvalky: ozdoba zahrady i bytu*. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha, 112 s. ISB: 8085362066
- [4] Decklerk, V., Korban, S. S. 1995. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata* L. *Journal of Plant Physiology*. 147. p. 441 – 446
- [5] Fraga, M., Alonso, M., Borja, M. Shoot regeneration rates of perennial *Phlox* are dependant on cultivar and explant type. *HorstScience* 39(6). p. 1373 - 1377
- [6] Gaar, V., Čermák, V. 2012. Hád'átka v produkci okrasných rostlin. *Zahradnictví*, 11 (5) s. 66 - 68
- [7] Golovkin, B. N., Kliková, G. a kol. 1990. *Trvalky: rozkvetlá zahrada (1)*. Lidové nakladatelství. Praha. 352 s. ISBN: 8070220538
- [8] Hanzelka, P. 2006. Málo vzrůstne druhy a kultivary plamenky. *Zahradnictví*, 97 (3), s. 32 - 35
- [9] Hanzelka, P. 2009. Ruské šlechtění a odrůdy druhu *Phlox paniculata*. *Zahradnictví*, 100 (12), s. 22 - 25
- [10] Hradilík, J. 2005. *Rostlinné explantáty*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 85 s. ISBN: 8071579157

- [11] Jain, A., Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. *Scientia Horticulturae*. 94. p. 137 – 143
- [12] Jha, T. B., Gosh, B. 2005. *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*. Universities Press. New Delhi. p. 206. ISBN: 8173714886
- [13] Kováč, J. 1995. *Explantátové kultury rostlin*. UPOL. Olomouc. 140 s. ISBN: 8070674938
- [14] LaMondia, J.A. 1999. Efficacy of insecticides for control of the foliar nematodes *Aphelenchoides fragariae* and *Ditylenchus dipsaci* in flowering perennial ornamentals. *Journal of Nematology* 31: 644 – 649
- [15] Novák, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia. Praha. 208 s. ISBN: 8020003444
- [16] Novák, J., Skalický, M. 2012. *Botanika: cytologie, histologie, organologie, systematika*. 3. vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788087415535
- [17] Matiska, P. 2005. Vysoké letní plamenky (*Phlox*). *Zahradnictví*, 97 (8), s. 34 - 35
- [18] Matiska, P. 2009. Využití metod *in vitro* pro získání výchozích šlechtitelských materiálů u plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.). *Disertační práce*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 199 s.
- [19] Procházka, S., Šebánek, J. a kol. 1997. *Regulátory rostlinného růstu*. Academia. Praha. 380 s. ISBN: 8020005978
- [20] Procházka, S. a kol. 2002. *Botanika Morfologie a fyziologie rostlin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 242 s. ISBN: 8071573132

- [21] Rakouský, S. 2001. Rostlinné explantáty. 1. vydání. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 99 s.
- [22] Russian Phlox society. *Russian Phlox society* [online]. 2013 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <http://www.russianphlox.com/catalog/kustovyie-floksyi-otechestvennoy-selektcii/>
- [23] Šafránková, I. 2006. Patogeny plamenky. *Zahradnictví*, 97 (3), s. 36 – 37
- [24] Smith, R. H. 2012. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3rd ed. Academia Press. San Diego. 208 p. ISBN: 9780124159204
- [25] Zouhar, M., Ryšánek, P., Tesařová, B., Marek, M. 2002. Metodická příručka pro diagnostiku karanténních háďátek rodů *Globodera*, *Meloidogyne* a *Ditylenchus*. PowerPrint, ČZU. Praha. 30 s. ISBN: 8021308737
- [26] Zouhar, M., Douda O. 2007. Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov v *in vitro* podmínkách. Edward Fencl – Logus. Praha. 31 s. ISBN: 9788021317673
- [27] Wehrhahn, H. R. 1952. *Taschenbuch der botanischen Pflanzennamen für Gärtner*. 5. Ausgabe. Killinger, Nordhausen am Harz, 256 s.

9 Seznam fotografií

- [1] Vyšniauskų gėlės. *Phlox paniculata* 'Anja Gaganova'. [fotografie]. Daylily-phlox.eu [online] Dostupné z: <http://www.daylily-phlox.eu/wp-content/uploads/2015/09/1-DSC02717-001-400x533.jpg>. Formát. 400x533.
- [2] *Phlox paniculata* 'Blue Paradise'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z <http://www.helenium-phlox.de/phlox/blue-paradise>. Formát. 377x504.

- [3] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Errötense Mädchen'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914191310-phlox-erroetendes-maedchen.jpg>. Formát. 377x507.
- [4] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Laura'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914192323-phlox-lachsjuwel.jpg>. Formát. 377x504.
- [5] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Molodost'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20101020105901-phlox-molodost.jpg>. Formát. 377x504.
- [6] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Mies Copijn'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914192822-phlox-mies-copijn.jpg>. Formát. 377x504.
- [7] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Igor Talkov'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914192013-phlox-igor-talkov.jpg>. Formát. 377x504.
- [8] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Jubilee'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20110918185701-phlox-jubilee.jpg>. Formát. 377x504.
- [9] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Sekret'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914194127-phlox-sekret.jpg>. Formát. 377x504.
- [10] Hartmut Rieger. Phlox paniculata 'Windsor'. [fotografie]. helenium-phlox.de [online] Dostupné z: <http://www.helenium-phlox.de/img/20100914194847-phlox-windsor.jpg>. Formát. 377x504.

10 Seznam použitých zkratek

MS - Murashige and Skoog medium (1962)

BAP - 6-benzylaminopurin

IAA - kyselina indolyl-3-octová

RRR - regulátor rostlinného růstu