

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

MARTINA PSOTOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Studium konverze somatických embryí smrku v rostliny
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. Helena Vlašínová, Ph.D.

Vypracovala:
Martina Psotová

Brno 2015



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Autorka práce: Martina Pačtová
Studijní program: Agrobiologie
Obor: Biotechnologie rostlin

Vedoucí práce: Ing. Helena Vlačínová, Ph.D.
Konzultant: Bělena Djančević

Název práce: **Studium konverze somatických embryí smrku v rostliny**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracování literárního přehledu o množení smrku a o možnostech využití in vitro metod při jeho šlechtění u nás i ve světě
2. Na základě něčeho popíše studentka jednotlivé fáze somatické embryogeneze smrku a navrhne maturační experimenty.
3. Studentka se naučí techniky práce v aseptických podmínkách, techniky přípravy kultivačních médií, naučí se pracovat s embryogenní kulturou včetně maturačních procesů
4. Experimenty budou zaměřeny na konečnou fázi maturation, konverzi v rostliny. Budou studovány faktory, které konverzi ovlivňují (osmóza, teplota, předcházející kultivační postupy)
5. Výstupem experimentů budou fotografie, tabulky a grafy, bude provedeno základní statistické zpracování výsledků
6. Součástí práce bude porovnání výsledků s literárními údaji, diskuse o optimálních kultivačních postupech vedoucích k získání životaschopných rostlin

Rozečet práce: 30

Literatura:

1. CHALUPA, V. *Reprodukce genových zdrojů lesních stromů metodami in vitro*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Lesnická fakulta, 2001. 50 s.
2. CHALUPA, V. *Zachování a reprodukce genových zdrojů lesních stromů*. 1. vyd. Praha: ČZU, 2000. 48 s. *ISSN* 80-213-0718-8.
3. JAIN, M. S. – KATSUAKI, I. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. 840 s. *Forestry Sciences*. *ISSN* 1-4020-1135-0.
4. KRAJČÁKOVÁ, J. – HAGGMAN, H. – GÖMÖRY, D. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2009. sv. 98, č. 3, s. 251–262. *ISSN* 0167-6957.
5. ĎURKOVIC, J. – KRAJČÁKOVÁ, J. *Micropropagation dřevin v podmínkách in vitro*. 1. vyd. Zvolen: Technická univerzita Zvolen, 2010. 82 s. *ISSN* 978-80-228-2118-6.
6. VLAŠINOVÁ, H. *Transfer rostlinových regulátorů při inkubaci somatické embryogeneze u smrku*. Diplomová práce. MZLU v Brně, 2005.

Datum zadání: říjen 2013

Datum odevzdání: duben 2015

Martina Pačtová
Autorka práce

Ing. Helena Vlačínová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.
Vedoucí ústavu

prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Studium konverze somatických embryí smrku v rostliny vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....

Martina Psotová

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. za pomoc a přátelský přístup při tvoření bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala paní Martině Jůzové za pomoc a čas strávený v laboratoři. Za cenné rady, nové zkušenosti a přátelský přístup. Na závěr děkuji své konzultantce Ing. Biljaně Đord'ević za poskytnutí svých zkušeností a literárních materiálů k této bakalářské práci.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou somatické embryogeneze u *Picea abies*. Součástí práce bylo srovnávání životaschopnosti rostlin při použití růstových regulátorů v médiu před procesem maturace a bez nich. Hlavní pozorování vlivů regulátorů bylo zaměřeno na poslední fázi maturace a fázi konverze v rostliny. Výzkum probíhal v laboratořích Mendelovy univerzity v Brně na Ústavu biologie rostlin. U podmínek v počátečních fázích byla uměle udržována temnostní fáze, stabilní teplota vzduchu $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ společně s umělou cirkulací vzduchu. V následujících fázích byla řízená fotoperioda, stabilní teplota vzduchu na úrovni $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ s umělou cirkulací vzduchu v kultivační místnosti. Ve výzkumu se projevil vliv růstových regulátorů u rostlin v konečné fázi maturace. Stejný výsledek byl zjištěný i u konverze v rostliny, kde byl zaznamenán pomalejší vývoj kořenů a nadzemních částí rostlin u varianty s přídavkem regulátorů růstu.

Klíčová slova: *in vitro*, konverze, maturace, *Picea abies*, růstové regulátory, somatická embryogeneze

Abstract

This work deals with somatic embryogenesis of *Picea abies*. Part of this work was to compare the viability of plant growth regulator when used before maturation and without them. The main observations of the effects of regulators focused on the final phase of maturation and phase conversion in the plants. The research was conducted in laboratories Mendel University at the Department of Plant Biology. For conditions in the early stages was artificially maintained darknes phase stable air temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ together with artificial air circulation. In the following phases photoperiod was controlled, stable air temperature at $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ with artificial air circulation in the cultivation room. Effect of growth regulators used before maturation was studied on plants at the final stage of maturation and during conversion to plants. Slower development of roots and aerial parts of plants in the variant with added growth regulators was observed.

Key words: conversion, *in vitro*, growth regulators, maturation, *Picea abies*, somatic embryogenesis

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Smrk ztepilý (Picea abies)	12
3.1.1	Systematické zařazení	12
3.1.2	Morfologie a biologie smrku	12
3.2	Množení smrku	15
3.2.1	Řízkování.....	15
3.2.2	Výběr matečnice.....	15
3.2.3	Termín odběru	16
3.2.4	Postupy odběru letorostů	16
3.2.5	Manipulace s letorosty	16
3.2.6	Další důležité kroky.....	17
3.3	In vitro	17
3.4	Somatická embryogeneze	18
3.4.1	Indukce	19
3.4.2	Proliferace	19
3.4.3	Maturace a desikace.....	19
3.4.4	Klíčení a konverze.....	20
3.5	Kultivační médium	20
3.5.1	Makroprvky	20
3.5.2	Mikroprvky	22
3.5.3	Vitamíny	24
3.5.4	Aminokyseliny	25
3.5.5	Cukry	25

3.5.6	Fytohormony	25
3.5.7	Gelotvorné činidlo	30
4	MATERIÁL A METODIKA	31
4.1	Rostlinný materiál.....	31
4.2	Kultivační podmínky	31
4.2.1	Proliferace	33
4.2.2	Maturace.....	34
4.2.3	Desikace	34
4.2.4	Germinace (klíčení).....	35
4.2.5	Konverze.....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6	ZÁVĚR	42
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	43
8	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	45
9	SEZNAM ZKRATEK	47
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	49

1 ÚVOD

Picea abies patří mezi nejvýznamnější dřeviny v České republice z hlediska hospodářského i svým rozšířením. Původní populace, které se na našem území zachovaly rozdělujeme na 3 ekotypy. Jedná se o ekotyp vysokohorský, horský a chlumní. Rozmnožování těchto dřevních populací je vysoce obtížné kvůli stáří jednotlivých stromů a prodlužujícími se intervaly mezi kvetením. U jehličnatých dřevin, nejvýznamněji u smrku, je možné použít k reprodukci a konzervaci vyžadovaných genotypů klonové množení, asexuální indukci embryí ze somatických buněk, tzv. somatickou embryogenezi (MALÁ a kol., 2010)

Proces regenerace jehličnatých dřevin pomocí somatické embryogeneze zahrnuje řadu definovaných vývojových etap, které vyžadují řádné splnění jednotlivých kroků pro úspěšné dokončení kroků dalších (PINKASOVÁ, 2012). Výsledky tedy potvrzují fakt, že smrk může být považován pro proces somatické embryogeneze za modelovou dřevinu, jelikož je schopen reagovat na mnoho rozdílných postupů (ČERMÁKOVÁ, 2012).

Somatická embryogeneze je název pro proces, ve kterém je využíváno embrya z tělních buněk. Pro tato embrya z tělních buněk se využívá název somatická embrya. Tato embryogeneze je jedním z mnoha možných způsobů pro kultivaci *in vitro*. Tato embryogeneze má potenciál jakožto levný nástroj na produkci velkého množství geneticky identických embryí. Aby toto bylo možné, je nutné znát přesně její průběh a podmínky, za kterých bude možné produkovat úspěšně se vyvíjející embrya (KADLECOVÁ, 2010).

Maturace je název pro proces, který obsahuje období od samotného vývinu somatických embryí a pokračuje až do vysušování, které je posledním krokem před samotným klíčením. Aby embrya dosáhla správného stupně završení dozrávání, tak musí dosáhnout optimální morfologickou a fyziologickou zralost. Samotný vývin somatického embrya jehličnanů musí být iniciovaný blokadou buněčné proliferace a to díky odstranění auxinu a cytokininu a následně pokračovat aplikací ABA. Tyto změny rostlinných hormonů v kultivačním médiu znamenají důležitou vývojovou změnu, která je nejdůležitější pro zdařilé zakončení embryogenního procesu (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010)

Tato práce se zabývá somatickou embryogenezí, především poslední fází maturace a konverzí v rostliny. Experiment byl prováděn na kultuře smrku ztepilého na půdě Mendelovy univerzity v Brně na Ústavu biologie rostlin. Pokus byl prováděn ve flow-boxu, ve sterilních podmínkách se sterilními přístroji. Kultury v jednotlivých fázích byly uloženy v kultivační místnosti podle fáze vývoje buď ve tmě, nebo při řízené fotoperiodě při $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ s řízenou cirkulací vzduchu. Pozorování bylo provedeno v poslední fázi maturace před desikací. Poté proběhlo srovnání v poslední fázi na zakořeňovacím médiu a v poslední fázi konverze v rostlinu a posouzení jednotlivých variant. Na vyhodnocení výsledku bylo využito matematicko-statistických postupů v programu Microsoft Office Excel 2007.

2 CÍL PRÁCE

- Vyhodnocení závěrečné fáze maturace při různých postupech, její grafické znázornění.
- Zaznamenání konverze v rostliny u variant s podporou růstových regulátorů a bez růstových regulátorů.
- Rozhodnutí o efektivnosti předmaturační fáze bez růstových regulátorů pro podporu produkce rostlin z embryogenálního množení.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Smrk ztepilý (*Picea abies*)

Tento statný strom z čeledi borovicovité, patří mezi hospodářsky významné dřeviny severní a střední Evropy (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Patří mezi Evropsky nejvyšší stromy (KREMER, 1995).

3.1.1 Systematické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení: nahosemenné (*Pinophyta*)

Třída: jehličnany (*Pinopsida*)

Řád: borovicotvaré (*Pinales*)

Čeľad: borovicovité (*Pinaceae*)

Rod: smrk (*Picea*) (NOVÁK, 1976)

3.1.2 Morfologie a biologie smrku

Tento jehličnatý strom dorůstá výšky 50m, avšak jsou i výjimky které dorůstají až 70m. Patří mezi nejpolymorfnější stromy svého rodu. Nachází se ve velmi rozsáhlých areálech. Je velmi dobře přizpůsobivý. Vezmeme-li na porovnání smrky ztepilé, každý z jednoho konce areálu, dostaví se nám výsledků, že jsou tyto stromy velmi rozdílné. Důvody rozdílů jsou různé. Mohou mít například jiné tvary koruny, nebo býti ovlivněny prostředím, ale také je to dáno dědičností (MUSIL, HAMERNÍK, 2007).

Kmen smrku poznáte podle jeho přímého, štíhlého až válcovité vzhledu. Často má dosti vyvinutý kořenový náběh (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Hladká a tenká kůra stromu zpočátku hnědé posléze červenohnědé barvy je dobrým poznávacím znakem. Borka smrku je do stáří stromu velmi slabá, šupinovitá s nádechem červenohnědé až šedohnědé barvy (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002). Ve spodní části kmene bývá často popraskaná (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Vyznačuje se žlutobílým zbarvením dřeva s dobře rozeznatelnými letokruhy, kde je velmi rychlý přechod jarního

a letního dřeva (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002). Dřevina je oblíbená pro svojí dobrou zpracovatelnost, která je dána pevností, měkkostí, lehkostí a pružností dřeva. Ve dřevě se nacházejí drobné pryskyřičné kanálky s vícevrstevnými dřeňovými kanálky.

Smrk ztepilý patří mezi stromy, které často podléhají větrným bouřím (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Tento znak je dán kořenovým systémem, který je od jiných stromů velmi variabilní, vyznačující se mělkou kořenovou soustavou, nedostatečně zakotvenou v půdě (MUSIL, HAMERNÍK, 2007), (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002). Nejsnadnější cílem větru jsou monokultury smrků zakotveny na podmáčené půdě. Při promrzání půdy, dochází ke zlomům stromu (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Na vývoj kořene mají vliv půdní podmínky. Kořeny smrku vyhledávají půdy s dostatkem kyslíku, půdy zásobené dostatkem živin. V takto dobrých podmínkách, mohou vytvořit svislou, hustě prokořeněnou kořenovou soustavu, dosahující hloubky okolo 6 m (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Nejlepší půdou pro smrky bývá nejvrchnější humusový horizont. Vyznačuje se dostatkem živin, provzdušněním, kořenový systém není prorostlý do takové hloubky. Kořeny mohou i při dotyku srůstat k sobě (MUSIL, HAMERNÍK, 2007).

Koruna smrku zaujímá kuželovitého vzhledu, která do svého stáří je velmi špičatá (KREMER, 1995). V nižších oblastech, si povšimneme širších korun smrku, než je to v horských oblastech, zde uvidíme užší koruny stromu. Pokud se poloha stromu nachází na stanovišti kde často vane z jedné strany vítr můžeme mluvit o jednostranné vlnkové koruně. Ve stejném případě je to i v zimních měsících, kdy dochází k obroušení strany stromu sněhem (MUSIL, HAMERNÍK, 2007).

Větvení u smrku je rozmanité, uvádí se 3 typy. Prvním typem je větvení hřebenité, další možností je deskovitý typ a na poslední místo zaujímá ježovitý typ, u kterého se jedná o přechodný typ (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). V dolní části kmene smrku nacházíme větve přeslenité, po nahlédnutí do prostřední části koruny stromu, ale uvidíme větve docela rovně odstávající nebo malinko vystoupavé (KREMER, 1995).

Protože se jedná o jehličnatý strom je na místě se zmínit o stavbě jehlic. Jehlice bývají 1-2 cm dlouhé, tmavozelené barvy. Po dotyku ucítíme, že jsou dosti tuhé,

typickým znakem jak hmatatelným tak i viditelným je čtyřhranný a zašpičatělý tvar jehlic (KREMER, 1995), (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002).

Doba kvetení je od měsíce dubna do měsíce května. Samčí květy šištice bývají vejcovitého tvaru dorůstající 2-2,5 cm. Vyrůstající mezi jehlicemi. Samičí šištice dorůstají až 6cm. Specifické postavení je pro ně vzpřímené, přisedlé, zdobené purpurově červenou barvou někdy také zelenou barvou. Vyrůstající na horní části koruny (KREMER, 1995), (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002), (MUSIL, HAMERNÍK, 2007).

Také poznáme smrk podle převislých, hnědavých šišek. Jejich velikost je v rozmezí 10-15x3-4 cm. Na povrchu se vyskytují ploché, tenké šupiny, které po pádu se nerozpadají. Dozrávání šišek je hned prvním rok na podzim (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002).

Semena jsou 2-5 mm dlouhá. Hnědavé někdy až černé barvy. Jeho tvar je smáčkle vejcovité a křídlo lžičkovitě prohloubené, které jde snadno oddělit. Počet děloh v semenáčku je od 5 do 10 (KOLIBÁČOVÁ, ČERMÁK, ÚRADNÍČEK, 2002), (MUSIL, HAMERNÍK, 2007).

V dnešní době má smrk ztepilý zastoupení v České republice 53% lesních ploch. Je to dáno častou výsadbou. Pokud by jsme brali přirozené zastoupení dosahoval by počet 11% (MUSIL, HAMERNÍK, 2007). Původní výskyt byl od Skandinávie po Balkán od 800 m nad mořem. Díky umělému rozšíření člověkem se s tímto stromem můžeme setkat všude na světě (KREMER, 1995).

Mezi příbuzné druhy patří smrk sibiřský (*Picea obavata*), lišící se krátkými jehlicemi. Jeho šišky jsou od ztepilého s celokrajnými a zaokrouhlenými šupinkami.



Obr. 1: Zralé šištice a květenství ♀ (KREMER, 1995)

3.2 Množení smrku

Mezi množicí metody patří autovegetativní metody. Pod tím si můžeme představit *in vitro* a řízkovací postupy. Patří mezi rychlou reprodukci populace dřevin. Těmito způsoby zaručujeme genetické identity dřeviny (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.2.1 Řízkování

Pokud porovnáme řízkování s metodou *in vitro*, dojdeme k výsledku, že jde o metodu technologicky jednodušší i uskutečnitelné v souladu s vybavením lesnických školek. Hlavním důležitým krokem je výsev a příprava matečnic dřevin (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.2.2 Výběr matečnice

Matečnici vybíráme podle cíle práce. Jestliže se jedná o vegetativní množení s cílem záchrany genofondu, nebo se jedná o šlechtitelský projekt nebo zda jde o běžnou produkci sadebního materiálu. Pro odběr jsou využívány i matečnice, které byly pro tento účel vypěstovány. Také je možné využít matečnice z klonového archivu (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.2.3 Termín odběru

Odběr řízků je možný ve třech termínech. První termín je v zimním období (jedná se o měsíce leden až únor). V tuto roční dobu mají řízky vysokou zakořeňovací schopnost. Dalším termínem je jarní období a to v měsíci březen. Zde mají zakořeňovací schopnost, ale nemusí být vynaložena energie k výhřevu skleníku. Posledním termínem je letní období, měsíc červen. V tento termín jsou odebírány polovyzrálé výhony. Úsilí je vynaloženo na stínění. Je ovšem nižší radiace (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.2.4 Postupy odběru letorostů

Ze stromů odebereme celé letorosty. Odběr provádíme zahradnickými nůžkami a to v přechodu dvouletého a jednoletého dřeva. Letorosty vybíráme aby byly vitální, zdravé a hlavně dobře vyvinuté. Nesmí mít poškozené jehlice a žádné kareční jevy. Běžná délka řízků se pohybuje od 8 do 15 cm (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).



Obr. 2: Odběr rostlinného materiálu pro řízkování z matečního stromu (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004)

3.2.5 Manipulace s letorosty

Nastříhané větve smrků musíme chránit před přehřátím a před ztrátou vlhkosti. Proto větve uskladníme v uzavřených přepravních obalech, nejčastěji jsou to platové

pytle. Které uschováme ve stínu a přepravíme do skladıştních místností, kde je můžeme ponechat maximálně 4 týdny. Optimální skladovací teplota se pohybuje od +2 až do +4°C. Ovšem nejvhodnějším krokem je provádět odběr letorostů z matečnic před samotným řízkováním. Vyhneme se tímto skladování a hlavně potencionálnímu nebezpečí poškozování (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.2.6 Další důležité kroky

Dále se s odebranými letorosty manipuluje v oblasti množirem. Zde se ověří rychlost zakořeňování řízku. Umístí se do zastíněných pařenišť a zvolí se nejvhodnější složení média pro zakořeňování řízku. Poté se upraví řízky a aplikuje se stimulant. Následuje zapichování řízku do substrátu a péče během jejich zakořeňování. Důležitým faktorem po čas všech procesů je udržovat optimální mikroklimatické podmínky v množárně. Mezi poslední kroky patří otužování zakořeňovaných řízku (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).



Obr. 3: Řízky zapichané do záhonu v množárně (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

3.3 In vitro

Označení *in vitro* je obecným názvem pro metody využívající explantátové kultury. Jde o kultivaci izolovaných rostlinných částí za sterilních podmínek (PINKASOVÁ, 2012). Tuto vědeckou metodu používáme v genetice tak i ve fyziologii. Ta má význam v klonování nejlepších vybraných jedinců ohrožených genofondu, v produkci geneticky identického materiálu pro pokusy ve šlechtitelství nebo pro

zabezpečení kvalitního sadbového materiálu (ČERMÁKOVÁ, 2011/2012). Dosáhneme cíle dopěstovat geneticky stabilního materiál bez virů, bakterií, houbových chorob a patogenních mikroorganismů. Patří sem i množení cestou somatická embryogeneze, která úspěšně regeneruje rostliny, především jehličnaté stromy (PINKASOVÁ, 2012).

3.4 Somatická embryogeneze

Patří mezi jednu z metod kultivace *in vitro*, která umožní uschovat a také reprodukovat cenný genotypový materiál původních populací (MALÁ, CVIKROVÁ, CVRČKOVÁ, MACHOVÁ, 2010). Jedná se o proces, při kterém se embryo vyvíjí ze somatických buněk (také se jim říká tělní buňky) (KADLECOVÁ, 2010). Somatická embrya se po vzniku nijak neliší od zygotických embryí. Ať se jedná o biologické i morfologické vlastnosti. Vytváření somatických embryí jde dvěma cestami. První přímá cesta probíhá pod inductivním vlivem hormonů z jedné buňky, nebo skupiny buněk somatických orgánů. Nepřímá cesta je z nediferencovaných buněk embryogenního kalusu nebo z buněčných suspenzí a také z protoplastových kultur (MALÁ a kol., 2010). Nejčastěji se vyskytující cesta bývá přímá somatická embryogeneze (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Pro iniciaci mitotického dělení a determinaci embryogenního stádia je důležitá přítomnost fytohormonů. Vznik embryogeneze závisí na faktorech jako jsou typ a koncentrace fytohormonů, původ a fyziologický stav explantátu (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Tato technologie je využívána v praxi při množení vánočních stromečků, množení stromů s dobrými vlastnostmi dřeva k danému účelu jako je třeba papírenský průmysl, k záchraně cenného rostlinného materiálu a mnoho dalších využití (KADLECOVÁ, 2010).

Jednotlivé fáze somatické embryogeneze lze rozdělit do čtyř kroků (ČERMÁKOVÁ 2011/2012):

- Indukce: jde o nastartování vývoje somatických embryí
- Proliferace: multiplikace růstu embryogenních buněk
- Maturace: fáze zrání somatických embryí a desikace
- Konverze embryí do somatické rostliny

3.4.1 Indukce

Jde o fázi, kde dochází k odebrání embryogenního pletiva z primárního explantátu na indukčním médiu (ČERMÁKOVÁ 2011/2012). Jako vhodný materiál se používají samičí gametofyty, ale i megagametofyty bez vyvinutých embryí. Jako další možnost primárního materiálu jsou samičí gametofyty s intaktními zygotickými embryi, kotyledonární embrya izolovaná ze semen odebraných z šišek. Také ze skladovaných suchých semen a mladých semenáčků. Médium je většinou obohaceno o fytohormony, hlavně o auxiny a cytokininy (ŘURKOVÍČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Kultivační médium obsahuje hlavně syntetický auxin 2,4-D. Ten je v nižších koncentracích a dokáže indukovat vznik plodů bez opylení květů (VLÁŠÍNOVÁ, 2005). Podle zveřejněných výzkumů, nejlépe prošla indukce na tuhém médiu. Mezi faktory ovlivňující indukční fázi patří koncentrace základních látek v médiu, pH, agar, světelný režim a hladina iontů dusíku (ŘURKOVÍČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Po odebrání z mateřské rostliny uskladníme explantáty do tmy při teplotě 22-25°C (ČERMÁKOVÁ 2011/2012). Jakmile dorostou do velikosti několik milimetrů je embryogenní pletivo přeneseno na proliferační médium (ŘURKOVÍČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.4.2 Proliferace

Proliferace nebo jinak řečeno udržování, je navazující fáze na iniciační fázi. Jde o neustálý růst embryogenních buněk (PINKASOVÁ, 2012). Po přenesení kultury na proliferační médium je pravidelně, po 10-14 dnech prováděna subkultivace buněk na čerstvé médium. (KADLECOVÁ, 2010). Pokud prodlužujeme dobu subkultivace, vede to ke ztrátě embryogenního potencionálu a zvýšenému počtu embryí s abnormálními strukturami. Kultury uskladňujeme ve tmě, při 22-25°C (ŘURKOVÍČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Proliferační médium obsahuje nižší koncentraci auxinů a cytokininů i nižší množství sacharózy (ČERMÁKOVÁ, 2012).

3.4.3 Maturace a desikace

Třetí krok je takzvané dozrávání. Jedná se o vytvoření zralých somatických embryí na kalusovém pletivu (PINKASOVÁ, 2012). Při maturační fázi embryo změní svojí stavbu. Embryo roste a hromadí v sobě zásobní látky. O této fázi se pojednává jako o nesložitější fázi celé somatické embryogeneze (MAULEROVÁ, 2007). Maturační fáze potřebuje změnu růstových regulátorů a různých koncentrací cukru v

médiu. U jehličnatých stromů je maturace podporována přidavkem ABA. Její funkcí je zabránění předčasnému dozrání embryí (ČERMÁKOVÁ, 2011/2012). Doba maturace probíhá asi 6 týdnů (MAULEROVÁ, 2007). Jako konečná fáze maturace je podstoupení suššího období sazenic. Fáze vysušení je přirozená událost během vývoje semena a nazýváme ji desikace. Nastoupení desikace vyvolává signál ke změně zrání embrya k nastoupení klíčení (MAULEROVÁ, 2007). Při úplném vysušení dojde ke stimulaci růstu embrya, kde bylo aplikováno více osmotika (ČERMÁKOVÁ, 2011/2012). Po ukončení desikace dojde k ukončení fáze přípravy na klíčení a nastupuje poslední fáze zvaná konverze (PINKASOVÁ, 2012).

3.4.4 Klíčení a konverze

U fáze germinace (klíčení) jde o přechod embryí do rostliny (PINKASOVÁ, 2012). Začátek klíčení nastává prodlužováním kořene. Jakmile se ukončí stádium prodlužování epikotylu, při kterém se vytváří jehlice, dojde k fázi konverze, tedy k úplnému závěru somatické embryogeneze kdy dojde k přeměně embrya na plně funkční autotrofní rostlinu (MAULEROVÁ, 2007). Poté je nutné přejít k přenesení rostliny do půdy ve skleníku. Klíčení se provádí na médiu bez růstových hormonů a s nízkým obsahem sacharózy, cytokininů a auxinů (ČERMÁKOVÁ, 2011/2012), (MAULEROVÁ, 2007). Ve skleníku udržujeme dostatečnou teplotu a tlumené světlo. Po aklimatizaci přeneseme rostliny do školek nebo na pokusné plochy. Musíme i po přenosu 3 týdny udržovat vysokou vzdušnou vlhkost (ČERMÁKOVÁ, 2011/2012).

3.5 Kultivační médium

Složení kultivačního média závisí na požadavku rostliny. Převážně se skládá z vody, minerálních látek, cukrů, aminokyselin, fytohormonů, solí a vitamínů (ĎURKOVIC, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1 Makroprvky

Patří mezi nejpotřebnější a nejvyužívanější prvky. Mezi makroprvky patří N, Mg, S, Ca, P, K (ĎURKOVIC, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1.1 Dusík

Dusík je důležitým prvkem, který přidáváme do média ve formě amonné soli (NH_4NO_3) a ve formě dusičnanu (KNO_3), $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$. Smrky nemohou syntetizovat dusík na organické molekuly, proto transportují látky xylémem z kořenů do nadzemní

části. Zde se uskuteční asimilace, kde dojde k redukci (NO_3^-) pomocí enzymu nitrát reduktázy na formu (NO_2^-). Dalším krokem je dusitan přeměněn na amoniak (NH_3), pomocí enzymu nitrit reduktázou. Celá přeměna dusitanu na amoniak probíhá na listech. Jelikož je amoniak toxický pro jehličnaté stromy musí se přeměnit na sloučeniny a to na aminokyseliny jako je asparagin, arginin, glutamin a další možnosti (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1.2 Síra

Síra je obsažena v aminokyselinách metioninu a cysteinu. Pokud je síra přijímána kořeny, tím pádem dochází k inhibici příjmu selenu. Ten ovšem je nezbytný, ale nenahradí síru (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998).

Síra je přijata jako síran SO_4^{2-} . Jako první krok je přeměna SO_4^{2-} na adenosinfosfosíran. Síra může být asimilovaná do redukované i nereduované formy. Síra se skupinami -SH, -S-, -S-S- se může vyskytovat v aminokyselinách jako je cystein a metionin. Asimilace na redukované formy probíhá v chloroplastech. Avšak v tylakoidech membrány chloroplastu se vyskytuje síra jako součást sulfolipidů. O síře je také psáno také jako o ligandu vázající kovy (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Velmi vzácný případ u rostlin je deficit síry (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998).

3.5.1.3 Vápník

Vápník se nachází v navázané formě na buněčnou stěnu a buněčnou membránu. Ionty Ca^{2+} jsou vázané na oxalát, jehož funkce je v osmoregulaci buňky. V buňkách je nízký obsah volných iontů Ca^{2+} , množství se pohybuje okolo $0,1\mu\text{M}$. Příjem iontů Ca^{2+} velmi ovlivňuje pH. Výrazný význam má vápník pro dělní buněk a zmnožení kořenů. Při nedostatku vápníku v rostlině dochází k nekrotickým na vrcholu výhonků (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1.4 Fosfor

Esenciální prvek fosfor je k nalezení ve struktuře nukleových kyselin, nebo také se vyskytuje v podobě fosfolipidů v biomembráně. Hlavním významem fosforu je zabezpečení energetického metabolismu a to pomocí pyrofosfátové vazby mezi atomy fosforu. Další výskyt fosforu je v buňkách s vakuolami. Zde máme dvě formy. První

formou je metabolická zásoba. Jde o formu fosfoesterů, které jsou v mitochondrii a cytoplasmě. Další forma je metabolická zásoba, kde se jedná o pyrofosfát vyskytující se ve vakuolách.. Hlavní zdroj fosforu z média je prostřednictvím sloučeniny KH_2PO_4 . Nedostatek fosforu poznáme podle projevu zpomaleného růstu a podle sytě zeleného zbarvení listů (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1.5 Draslík

Draslík má funkci v regulaci vodního provozu. Jedná se o prvek, který je významným osmotikem a jeho význam se projevuje i v dlouživém růstu buněk (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998).

Draslík je velmi dobře mobilní prvek při transportu xylémem a floémem na dlouhé vzdálenosti. Hlavní funkcí má v osmotické regulaci buňky. Také je aktivátorem mnoha enzymů. Uvádí se, že více jak 50 enzymů je díky draslíku stimulováno nebo aktivováno (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.1.6 Hořčík

Hořčík je úzce spojen s fotosyntézou (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998). Jedná se o centrální atom vyskytující se v molekule chlorofylu fotosystému I a II. Díky hořčíku se zachovávají terciální struktury enzymsubstrátového komplexu. Aby mohl enzym RNA polymerázy být aktivní a syntetizovat molekuly RNA vyžaduje přítomnost hořčíku (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Podílí se na vytvoření gran a světlosběrných pigmentů v chloroplastech (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998).

3.5.2 Mikroprvky

Jedná se o prvky, které se nevyskytují ve velkém množství jako například makroprvky, ale i v malém množství jsou pro rostlinu nepostradatelné. Do této skupiny patří prvky jako Zn, Cu, Mn, Fe, B, Cl, Co, Mo (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.1 Zinek

Jehličnaté stromy zinek přijímají jako iont Zn^{2+} . Vytváří tetraedrické komplexy. Významný je pro proces proteosyntézy nebo pro syntézu tryptofanu. Nedostatek zinku má za následek nevyvinutí chloroplastů, snížené množství chlorofylu a také krátké internódia na malých výhonech (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.2 *Měď*

Dřeviny přijímají měď v podobě dvojmocného kationtu nebo v podobě měďchelátového komplexu. Měď nalezneme v rostlinných buňkách navázanou hlavně na chloroplastech. Pokus strom trpí deficiencí mědi projevuje se to na změně struktury chloroplastů. Vytváří molekuly plastokyaninu, intermediátu v elektronovém transportním řetězci mezi fotosystémem I a II. Je zanesený do struktury enzymu lakázy. Ta je zapotřebí pro syntézu dalších přenašečů elektronů. Společně se zinkem tvoří strukturu enzymu superoxid dismutázy (Cu-Zn.SOD). Enzym je využíván pro neutralizaci vysoko reaktivního superoxidovaných radikálů O_2^- , ty se nachází především v chloroplastech mladých listů. Malá část je lokalizována v mitochondriích (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.3 *Mangan*

Mangan je přijímán jako iont Mn^{2+} (ĎUKROVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Jeho funkce je při vytváření lamelární struktury tylakoidů v chloroplastech. Jedná jako koenzym nebo aktivátor dehydrogenáz, hydroxyláz, dekarboxyláz a další enzymů (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998). Je začleněn do Hillovy reakce ve fotosystému II, při této reakci dochází k hydrolýze vody na kyslík a proton. 4 atomy tvoří enzym o kterém se předpokládá, že katalyzuje tuto reakci. Nedostatek se projevuje ve změně struktury chloroplastů (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.4 *Železo*

Železo je vázáno ve stromech na chelátové komplexy. Volné ionty Fe^{2+} a Fe^{3+} se nacházejí v buňkách v malých koncentracích. Stromy mohou přijímat pouze Fe^{2+} . Proto jsou ionty Fe^{3+} redukovány na Fe^{2+} . Redukce probíhá na povrchu kořenů. Poté jsou transportovány do cytoplazmy. V železoproteinové skupině je železo navázané na -SH skupinu a to na cysteinu nebo anorganické síry. Jako zástupce je například feridoxin, který má funkci přenašeče elektronů v reakci katalyzovaného nitrit reduktázou, sulfát reduktázou a také nitrogenázovým komplexem. Železo je významný prvek v oblasti biosyntézy chlorofylu. V podmínkách in vitro je růst jehličnatých dřevin podpořený přidavkem chelátu FeNaEDTA (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.5 Bor

Prvek boru je důležitý pro dostatečný floémový transport sacharózy. Nezbytnou funkci prokazují při klíčení pylu. Plní funkci posla ve fyziologických procesech (PROCHÁZKA, MACHÁČKOVÁ, KREKULE, ŠEBÁNEK A KOLEKTIV, 1998).

Bor nalezneme ve formě borat esterů. Ty jsou součástí hemicelulózy, která tvoří buněčnou stěnu. Nedostatek boru se projevuje v inhibici růstu primárních a sekundárních kořenů (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.6 Chlór

Dřeviny přijímají chlor ve formě chloridů Cl^- . Funkcí Cl^- je v oblasti osmoregulace a kompenzace nábojů. Chloridové ionty převážně ovlivňují funkci průduchů. Při dostatečném zvýšení množství iontu K^+ průduchů se otevírají. Při nízkém obsahu iontu K^+ mají signál k zavření průduchů. Jsou také součástí regulace osmotického potenciálu vakuol, ale také působí jako kofaktor v Hillove reakci u hydrolýzy vody. Chloridy aktivují enzymy jako je asparagin syntetáza, ten přemění glutamin na asparagin a kyselinu glutamovou. Také je využíván v metabolizaci dusíku (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.7 Kobalt

Kobalt je součástí vitamínu B_{12} , ten zasahuje do syntézy nukleových kyselin (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.2.8 Molybden

Tento prvek bývá přijímán ve formě vodního roztoku jako molybdenan (MoO_4^{2-}). Enzymy nitrogenáza a nitrát reduktáza jsou komplexy, které obsahují ve své struktuře molybden (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.3 Vitamíny

Vitamíny jsou důležitou složkou pro biochemické reakce probíhající za morfogennických procesů. Do média pro kultivaci v in vitro podmínkách se přidávají skupiny vitamínu jako jsou B_1 (tiamin), B_6 (pyridoxin), kyselina nikotinová a myo-inozitol. Ve specifických případech se také můžeme setkat s přísadkou vitamínu jako je vitamín C, E, kyselina pantotenová, kyselina listová. Tyto vitamíny se přidávají v případech pokud si je konkrétní rostlina, kultura vyžaduje (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny slouží jako náhrada za ionty NH_4^+ . Je tomu tak, kvůli procesu asimilace kde je anorganický dusík přeměn do aminokyseliny. Ty jsou dále využity v procesu proteosyntézy, kde jsou jako základní stavební jednotky v enzimech a proteinech. Jediné aminokyseliny L-izomery jsou biologicky aktivní. Nejvíce využívanou aminokyselinou je glycin. Ten slouží při ochraně buňkových membrán před osmotickými a tepelnými stresy (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.5 Cukry

Dřeviny ztrácí v podmínkách *in vitro* schopnost autotrofie. Proto se do média musí přidávat exogenní zdroj uhlíku. Tuto funkci přebírá cukr a to sacharóza. Sacharóza ovšem má inhibiční vliv na biosyntézu chlorofylu a fotosyntézu. Při autoklávování se mění sacharóza na glukózu a fruktózu. Po pokusech se došlo k výsledku, že kultury lépe rostou na autoklávovaném médiu, než na sacharóze sterilizovanou filtrací (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6 Fytohormony

Fytohormony napomáhají explantátové kultuře regulovat jejich růst. Jedná se o chemické přenašeče signálů pro růst. Tyto nositelé jsou v dřevinách v malém množství, vzhledem k vysoké aktivitě už při malých koncentracích. V explantátové kultuře rozdělujeme fytohormony na exogenní a endogenní (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Exogenní fytohormony přidáváme do média podle růstového procesu v experimentu. V *in vitro* kultuře jsou endogenní fytohormony syntetizované buňkami. Tato syntéza může být na více rostlinných pletivech zaráz. Dál jsou fytohormony transportovány z místa vzniku na místo působení. Jejich základní charakteristický rys je jejich ovlivňující vliv v širokém rozsahu biologických procesů. Nejvýznamnějšími fytohormony pro dřeviny jsou auxiny a cytokininy. Ostatní fytohormony aplikujeme v případě určitých situací. Endogenní fytohormony v oblasti biosyntézy, jsou ovlivňovány exogenními fytohormony. Novými postupy v dnešní době je používání chemických sloučenin, které mají fytohormonální povahu s regulačním vlivem na růstové procesy rostliny. Jako příklad chemické sloučeniny můžeme uvést brassinosteroidy, kyselinu salicylovou nebo urodil a mnoho dalších (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Fytohormon:	Hlavní účinek v podmínkách <i>in vitro</i>:
Auxiny: kyselina indol-3-octová (IAA) kyselina indol-3-máslová (IBA) kyselina 1-naftyloctová (NAA) kyselina fenylloctová (PAA) kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) kyselina 4-chlor-indoloctová (4-Cl-IAA) kyselina 4-chlorfenoxyoctová (4-CPA)	tvorba adventivních kořenů (při vyšší koncentraci) tvorba adventivních výhonků (při nízkých kon.) indukce somatické embryogeneze (hlavně 2,4-D) buněčné dělení tvorba a růst kalusu inhibice prodlužovacího růstu kořenů inhibice růstu axilárních pupenů
Cytokininy: 6-benzylaminopurin (BAP) zeatin (Z) zeatinribosid (ZR) izopentenyladenin (iP) kinetin (KIN) tidiazuron (TZD) 2-chloro-4-pyridyl-fenylmočovina (4-PPU)	tvorba adventivních výhonků (při vyšší konc.) inhibice tvorby adventivních kořenů buněčné dělení tvorba a růst kalusu stimulace růstu axilárních pupenů inhibice prodlužovacího růstu výhonků inhibice stárnutí listů
Gibereliny: kyselina giberelová (GA3) giberelin 1 (GA1) giberelin 4 (GA4) giberelin 7 (GA7)	prodlužovací růst výhonků překonání dormance semen, apikálních pupenů nebo somatických embryí inhibice tvorby adventivních kořenů inhibitor biosyntézy podporující tvorbu kořenů inhibitor biosyntézy ulehčující aklimatizaci
Kyselina abscisová:	dozrávání somatických embryí ulehčení procesu aklimatizace <i>ex vitro</i> podpora nástupu dormance
Etylén:	stárnutí listů tvorba a inhibice adventivních výhonků
Polyaminy: putrescin spermin spermidin	podpora tvorby adventivních kořenů podpora tvorby výhonků podpora somatické embryogeneze

Tabulka 1: Účinky fytohormonů na kultivaci dřevin v podmínkách *in vitro* (ĎURKOVICĚ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.1 Auxiny

Auxiny patří mezi běžně využívané fytohormony. Slouží k podpoře morfogeneze explantátové kultury, hlavně s přidavkem cytokininů. Mezi přírodní auxiny syntetizované in planta patří IAA, IBA, PAA, 4-Cl-IAA. Jako syntetizované auxiny uvádíme NAA; 2,4-D; 2,4,5-T; 4-CPA. Jejich hlavním charakterem exogenní aplikací je vliv na tvorbu adventivních kořenů. Avšak ve vysoké koncentraci mají na kořeny inhibiční účinek (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Zvýšením koncentrace cytokininů a snížením koncentrace auxinů dojdeme k tvorbě nových výhonků v explantátové kultuře. Vyrovnané koncentrace aplikujeme na indukci tvorby kalusové kultury dřevin dvouděložných. Dřeviny jednoděložné potřebují ke vzniku kalusu jen samostatný auxin ve vyšších koncentracích. Auxiny mají za následek inhibici vůči přerůstání axilárních pupenů na výhonky. Explantátové kultury přijímají auxiny přes řezné rány. Z důvodu nepropustnosti auxinů přes epidermis. Příjem fytohormonu zprostředkovává difúze s aktivním přenosem pomocí nosiče a je velmi rychlý. Z buňky jsou transportovány prostřednictvím přenašeče. Jako přenašeč je transmembránový PIN protein Auxiny patří mezi sloučeniny rychle vyčerpané z kultivačního média. Explantátová kultura přijme auxin, který následně reaguje v metabolismu s dalšími sloučeninami. Připojením auxinu s malými molekulami je nazýváno konjugace. Po konjugaci vytvoříme estery, amidy a glykosidy, které se po sléze stávají neaktivními (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

- 2,4-D : Řadíme ho mezi syntetizované auxiny. Patří k silným sloučeninám. Především u inhibice tvorby kalusu a somatických embryí. Oslabený účinek je v případech tvorby primordií adventivních kořenů a inhibice růstu axilárních pupenů. Tuto funkci přebírají auxiny IBA nebo IAA (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).
- IAA a IBA : Auxin IAA patří mezi nejméně stabilní sloučeniny, které podléhají oxidaci při působení světla. Stejně jako IAA také IBA podléhá fotooxidaci.

Blokování transportu auxinů, závisí na TIBA a NPA. Je to způsobeno vázáním na auxinové nosiče. Jako antiauxin, konkurující při navazování na auxinový receptor se chová PCIB (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.2 Cytokininy

Většina těchto hormonů je odvozen z purinových látek. Můžeme, ale také nalézt nepurinové látky, které hrají v rostlině stejnou roli jako cytokininy. Jsou tvořeny v kořenech odkud jsou dále vedeny do nadzemních částí rostliny (PSOTA, ŠEBÁNEK, 1999). Cytokininy rozdělujeme na přírodní kam patří Z, DHZ, iP, DHZE, iPA, BAP, který je nejvíce používaný. Skládají se z purinové báze. Některá izolovaná pletiva nebo orgány nemohou v *in vitro* podmínkách dobře biosyntetizovat endogenní cytokininy. Z toho to důvodu byly objeveny syntetické cytokininové analogy (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Cytokininy bez purinové báze mají vysokou aktivitu a uplatňují se v kultivaci dřevin. Zde řadíme TDZ, 4-CPPU. Analogy, složené z purinové báze mají zástupce jako je KIN. Hlavní vlastností cytokininů je účinek na morfogenetické procesy jako je stimulace buněčného dělení. Při absenci cytokininů dochází k prodloužení stádia metafáze. To znamená, že mají vliv na regulaci syntézy proteinů, které se podílejí na tvorbě aparátu dělicího vřetenka (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Cytokininy se vyžadují pro zabezpečení proliferace kalusových buněk. Vysoké koncentrace inhibují prodlužovací růst výhonků. Ty zůstávají zakrslé a nemohou se použít na zakořeňování. Zvláštní aplikace cytokininů zamezuje stárnutí explantátové kultury nebo inhibují nadměrnou tvorbu kořenů. V metabolismu jsou Z, ZR, 2-iP dále konjugovány nebo také oxidovány. Cytokininy jako DHZ, DHZR, BAP jsou pouze konjugovány. Stabilní sloučenina je cytokinin BAP. Mezi nepurinové a chemicky stabilní cytokininy řadíme 4-CPPU, TDZ a metabolizovaný většinou volný, nekonjugovaný je TZD. Do molekuly t-RNA je zabudován nativní cytokinin (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.3 Gibbereliny

Patří mezi terpenoidní sloučeniny. Jsou tvořeny z kyseliny mevalonové. Produkují je mladé listy, semena a kořeny (PSOTA, ŠEBÁNEK, 1999).

Účinkem gibberelinů se jedná ohledně překlenutí dormance semen nebo pupenů, stimulace prodlužování růstu výhonku. Také podporují kvetení a degradaci zásobních látek v semenech. Inhibiční vliv mají gibbereliny na tvorbu somatických embryí, nebo na tvorbu adventivních výhonků a kořenů. Projev inhibičních reakcí závisí u druhů dřevin

na genotypu. Známe asi 90 giberelinů, kde používané jsou GA₃, GA₁, GA₄ a v neposlední řadě GA₇ (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Pokud se vyskytují v rostlině ve vyšším množství, nepůsobí toxicky (PSOTA, ŠEBÁNEK, 1999).

Inhibitory jako paclobutrazol, ancymidol patří mezi více využívané než samotné gibereliny. Mají účinek k podpoře dozrávání embryí, zvýšení schopnosti adventivní rhizogeneze výhonků, v neposlední řadě ulehčují proces aklimatizace v podmínkách *ex vitro* (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.4 Kyselina abscisová

Stejně jako v případě giberelinů jsou tvořeny z kyseliny mevalonové. Ze starých listů, kde je tvořena ABA, je transportována do dalších částí rostliny.

ABA se vyznačuje úlohou v dormanci embryí a pupenů. Také má vysoký účinek při opadu listů. Při stresových podmínkách, které jsou způsobeny suchem je akumulovaná ABA. Tato vlastnost má vliv na otevírání a zavírání průchodů. ABA v prostředí *in vitro* způsobuje inhibici růstu výhonků a klíčení embryí. Flurid je inhibitorem biosyntézy ABA. Inhibitor blokuje i syntézu chlorofylu. Dormanci explantátové kultury se zabráňuje použitím fluridonu (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.5 Etylen

Etylen patří do kategorie plynů. Biosyntéza etylenu při dozrávání plodů a stárnutí se zvyšuje. V *in vitro* je stimulovaná biosyntéza etylenu pomocí auxinů a stresových faktorů. Ovšem inhibitorem biosyntézy etylenu je AVG. Negativní vliv etylenu je podpora stárnutí listů, zvýšená citlivost na adventivní organogenní podmět. AVG blokuje prekurzor etylenu čímž je ACC. Aplikací ACC napomáháme k zvýšení množství etylenu v pletivech (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.6 Polyaminy

Ve dřevinách se vyskytují vysoké hladiny alyfatických polyaminů, které pomáhají v růstu. Polyaminy jsou brány za nepravé fytohormony protože je přidáváme do média ve vysokých koncentracích. K nejpoužívanějším aminům zmiňujeme putrescin, spermidin, spermin. Hlavní účinek mají ve stimulaci růstu a na dělení buňky. Také lze zvyšovat regeneraci výhonků, kořenů a embryí. Můžeme tím i regulovat

kvetení. Syntetizací methioninu vychází arginin, spermin a spermidin (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.6.7 Kyselina jasmonová

Poraněním pletiv dojde k degradačním procesům lipidů v buněčné membráně a tím se tvoří kyselina jasmonová. Aktivují syntézu stresového proteinu. Také dále působí na morfogenezi, podporu regenerace. Vychází sloučenina jako je kyselina linolenová napomáhá k biosyntéze kyseliny jasmonové (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

3.5.7 Gelotvorné činidlo

Agar nebo další gelotvorné činidla se používají na přípravu tuhých nebo také polotuhých médií. Agar je přírodní produkt, který je tvořen směsí polysacharidů. Hlavní výhodou je, že nereaguje s dalšími přísadami v médiu. Enzymy explantátu agar neštěpí a je stále stabilní i při tepelném rozsahu kultivace (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

K experimentu byla použita embryogenní kultura smrku ztepilého (*Picea abies*), z linie III-3-3. Vzorek byl získán od Ing. Biljany Ďorděvič z Ústavu biologie rostlin, Mendelovy univerzity v Brně. Embryogenní kultura byla poprvé odebrána na proliferační médium dne 19.2.2014

4.2 Kultivační podmínky

Celá experimentální práce byla prováděna na Ústavu biologie rostlin, Mendelovy univerzity v Brně.

Kultury byly založeny a dále pasážovány ve sterilních podmínkách ve flow-boxu (Thermo scientific, Heraguard). Kultivace byla uskutečněna v klimatizované kultivační místnosti. Prvně v tmavém prostředí a v poslední řadě v kultivační místnosti s pravidelnou fotoperiodou v závislosti na fázi somatické embryogeneze.

Použitá média byla složena viz. *Tabulka 2,3,4,5.*

LP maturační : 300ml (pH 5,7 - 5,8)	
Makroprvky	0,750g
Mikroprvky	0,300ml
Inositol	0,030g
Kasein	0,300g
Sacharosa	8,1g
Phytigel	1,05g
ABA 32μM	0,0025g
Glutation	0,150g

Tabulka 2: Složení maturačního média na 300ml, při pH 5,7 - 5,8

LP tekuté: 300ml (pH 5,7 - 5,8)	
Makroprvky	15ml
Mikroprvky	0,150ml
Fe	0,750ml
Vitamíny	0,300ml
Inositol	0,030g
Kasein	0,150g
Sacharosa	6g

Tabulka 3: Složení tekutého média na 300ml, při pH 5,7 - 5,8

LP zakořeňovací I.: 300ml (pH 5,7 - 5,8)	
Makroprvky	0,750g
Mikroprvky	0,300ml
Inositol	0,030g
Kasein	0,300g
Sacharosa	4,5g
Manitol	3g
Gerlit	1,05g
Aktivní uhlí	1,2g
Glutation	0,150g

Tabulka 4: Složení zakořeňovacího média I. na 300ml, při pH 5,7 - 5,8

LP zakořeňovací II.: 300ml (pH 5,7 - 5,8)	
Makroprvky	0,375g
Mikroprvky	0,150ml
Inositol	0,015g
Kasein	0,150g
Gerlit	1,05g
Agar	1,2g
IBA	0,18 μ M
Glutation	0,075g

Tabulka 5: zakořeňovacího média II. na 300ml, při pH 5,7 - 5,8

V následujících *Tabulkách 6,7,8,9* je uvedeno složení makroprvků, mikroprvků, železa a vitamínů obsažených v kultivačních médiích.

KH_2PO_4	3,4g
KNO_3	19,0g
NH_4NO_3	24,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,05g

Tabulka 6: Složení makroprvků 50 ml/l

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,23g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,86g
H_3BO_3	0,62g
KJ	0,083g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025g
$\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025g
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025g

Tabulka 7: Složení mikroprvků 0,5ml/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,780g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,723g

Tabulka 8: Složení FeEDTA 5 ml/l

Thiamin HCl	0,10g
Nikotinová kyselina	0,05g
Pyridoxin	0,05g
Glycin	0,20g

Tabulka 9: Složení vitamínů 1 ml/l

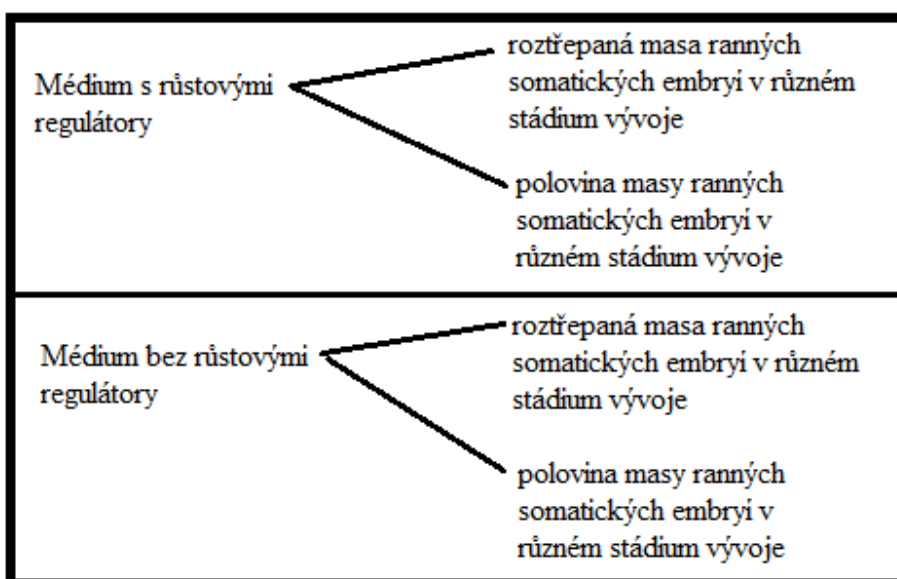
4.2.1 Proliferace

V tomto začátečním pokusu byla použita živná média LP. Jak bylo už zmíněno, první odebrání embryogenní kultury na proliferační médium proběhlo dne 19.2.2014. Odběr ze založených proliferačních kultur byl přepasážován každých 14 dní na nové živné LP médium. Vzniklé embryogenní pletivo bylo pečlivě vybráno a přeneseno na LP médium, za pomoci sterilní jehly. Světelný mikroskop sloužil k lepšímu pozorování a

výběru embryogenních kultur. Cílem tohoto kroku bylo seznámit se praktikami, nástroji a s celou prováděnou metodou. Po přenosu byly kultury na Petriho miskách uskladněny v kultivační místnosti ve tmě při 25 °C. Tento postup byl opakován až do data 4.8.2014.

4.2.2 Maturace

Pro proces zrání embryí byla embrya přenesena z proliferačního média na maturační. V této fázi byly embryogenní kultury rozděleny na 4 typy experimentu. Hlavním cílem je určit zda se lépe bude dařit kulturám, kultivovaným před maturací na médiu s růstovými regulátory nebo na médiu bez přidaných růstových regulátorů. Také zda je pro kulturu lepší ji roztřepat po dobu jedné minuty před nanesením na maturační médium. Nebo zda se jí bude lépe dařit po vložení poloviny inokula. Kultury byly ponechány na maturačním médiu do 11.9.2014. Poté byly přeneseny na stejné maturační médium. Byl sledován vývoj vznikajících somatických embryí, počet vyvinutých embryí a barevné změny. Po ukončení maturační fáze byl na Petriho miskách spočítán počet vzniklých embryí v globulární, prekotydonární a kotyledonární fázi vývoje a byly zaznamenány nekrózy.



Obrázek 6: Schéma rozdělení pokusu.

4.2.3 Desikace

Fáze desikace je nejdůležitější fází celé somatické embryogeneze (MAULEOVÁ, 2007). Vzniklé embryogenní kultury vložíme na Petriho misku s filtračním papírem. Včetně vysušovacího procesu, musíme nastolit i vlhkost prostředí,

přidáním destilované vody. Aby se destilovaná voda nedostala k filtračnímu papíru byla embrya vložena na filtrační papír do malých vnitřních misek a ve vnějších Petriho miskách byla nalita destilovaná voda. Proces desikace probíhal po dobu 3 týdnů. Misky byly uloženy v kultivační místnosti ve světelné fázi s teplotou okolo 25°C.

4.2.4 **Germinace (klíčení)**

Po fázi desikace byla vybraná zralá embrya přenesená na živná média určená k zakořeňování. Stále byl sledován vývoj embryí u všech variant. Média obsahovala přírůstek aktivního uhlí. Tato fáze měla za cíl dosáhnout rozvoje zralých embryí do juvenilní rostlinky. Jedná se tedy o prodloužení, vývoj kořenů a nadzemní části. Zde byly pozorovány změny v rychlosti vývoje mezi jednotlivými variantami a to tedy mezi přírůstkem růstových regulátorů a bez růstových regulátorů. Na zakořeňovacím médiu jsem ponechala rostliny měsíc a poté jsem přenesla znova kultury na nové zakořeňovací médium kde byly kultury ponechány další měsíc.

4.2.5 **Konverze**

U fáze nazývané aklimace dochází k přenesení zakořeněné rostlinky z média do půdního substrátu. Postupně začínáme rostlinky aklimatizovat do podmínek *ex vitro*. Květináče umístíme do skleníku s dostatkem světla a zakryjeme mikrotenovým sáčkem. Pro udržení vlhkosti rostlinky rozprašovačem stříkáme destilovanou vodou. Postupně odkrýváme sáček až dojdeme k fázi kdy mikrotenový sáček není potřeba a můžeme rostlinky přenést do školek.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

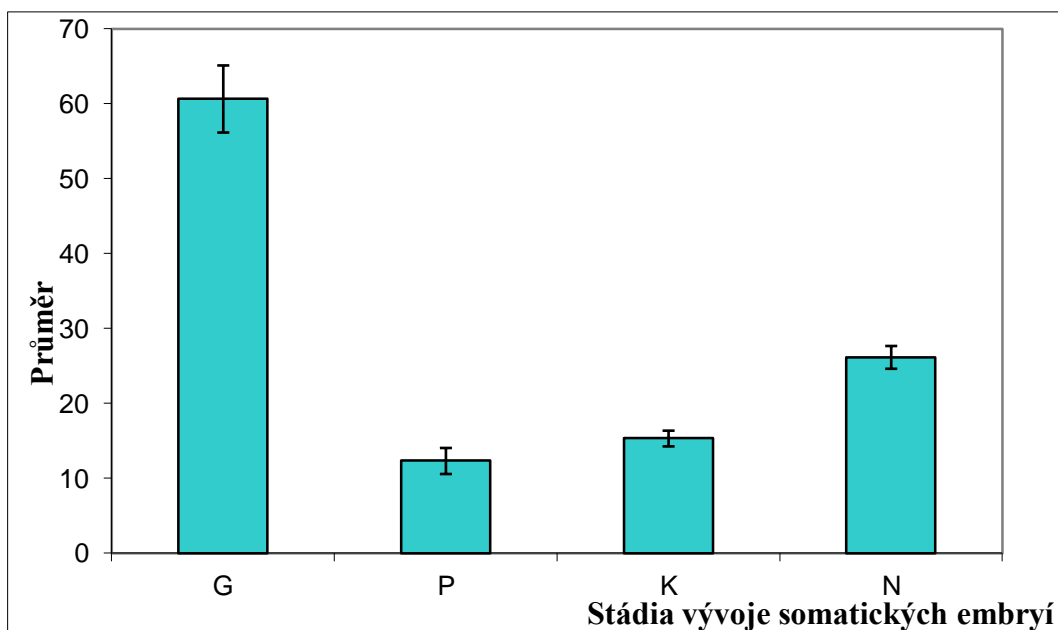
Vyhodnocení výsledků začíná od doby maturace, kdy byl experiment rozdělen na 4 kategorie. Vyhodnocení bylo provedeno matematicko-statistickými metodami s využitím programu Microsoft Office Excel 2007. Byly vypočítány základní statistické data jako jsou průměr, směrodatná odchylka a konfidenční interval. Pro vyhodnocení byla použita hladina pravděpodobnosti 95%. Zaznamenané hodnoty jsou pouze orientační z důvodu nepřesného počítání vzniklých globulí, prekotydonalů, kotyledonalů a nekróz. Dále vyhodnotíme zda je to statisticky průkazné nebo zda statisticky neprůkazné z 95%.

V lednu 2015 došlo ke kontaminaci varianty bez růstových regulátorů s polovinou embryogenního kalusu. Z tohoto důvodu již nebylo dále možno pokračovat s danou variantou.

- Médium s růstovými regulátory (LP)

	G	P	K	N
1	47	9	14	18
2	92	19	16	32
3	53	23	16	22
4	51	9	15	23
5	49	8	22	29
6	72	6	9	33
PŮMĚR	60,66667	12,33333	15,33333	26,16667
SMODCH	16,25491	6,315765	3,815174	5,520165
CONFIDENCE	4,475941	1,739105	1,050544	1,520029

Tabulka 10: Vypočítané hodnoty z média u kultur s růstovými regulátory a roztřepané na třepačce. (LP-T)



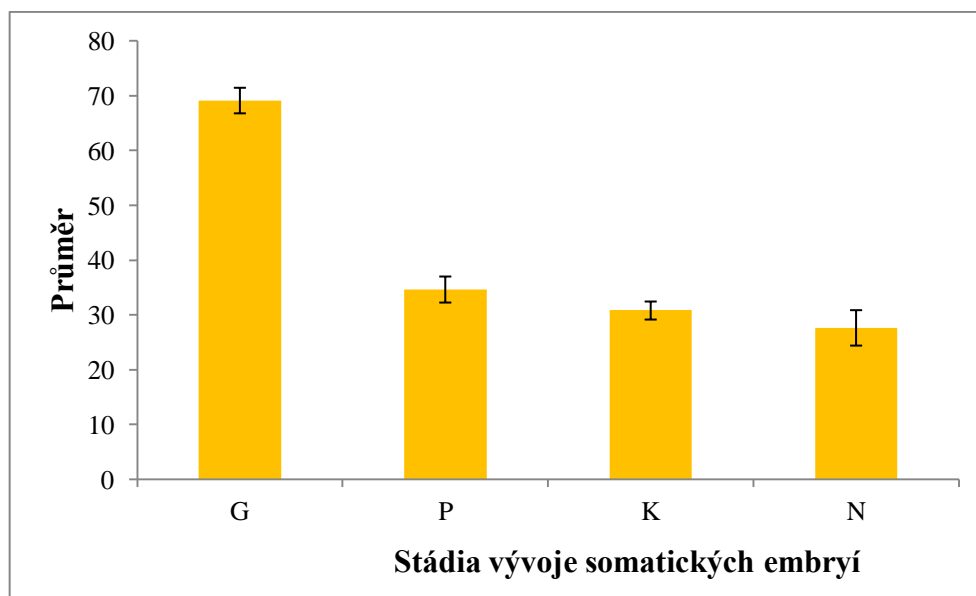
Graf 1: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur u kultur s růstovými regulátory a roztřepané na třepačce. (LP-T)

Chybové úsečky zobrazují konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$

Podle Grafu 1 jsou rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi statisticky průkazné s pravděpodobností 95%.

	G	P	K	N
1	72	46	41	11
2	71	25	28	15
3	61	23	27	36
4	73	42	30	41
5	82	40	23	24
6	56	32	36	39
PŮMĚR	69,16667	34,66667	30,83333	27,66667
SMODCH	8,473816	8,634556	5,983774	11,74261
CONFIDENCE	2,333344	2,377605	1,647688	3,233437

Tabulka 11: Vypočítané hodnoty z média u kultur s růstovými regulátory a neroztřepané na třepačce. (LP-3)



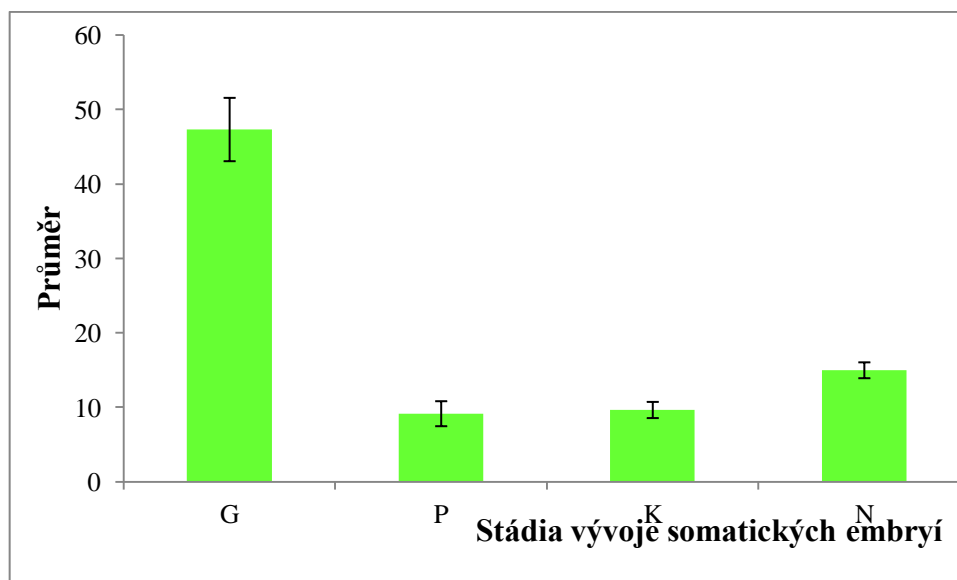
Graf 2: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur s růstovými regulátory a neroztřepané třepačce. (LP-3)

Podle Grafu 2 jsou výsledky statisticky průkazné u lobulárního stadia, u dalších jsou rozdíly neprůkazné s pravděpodobností 95%.

- Bez růstových regulátorů (LP-RL)

	G	P	K	N
1	41	4	8	8
2	31	19	12	17
3	62	1	6	15
4	70	6	15	15
5	28	12	4	21
6	52	13	13	14
PŮMĚR	47,33333	9,166667	9,666667	15
SMODCH	15,44524	6,094168	3,944053	3,872983
CONFIDENCE	4,252991	1,678086	1,086032	1,066462

Tabulka 12: Vypočítané hodnoty z média u kultur bez růstových regulátorů a roztřepané na třepačce. (LP-RL-T)

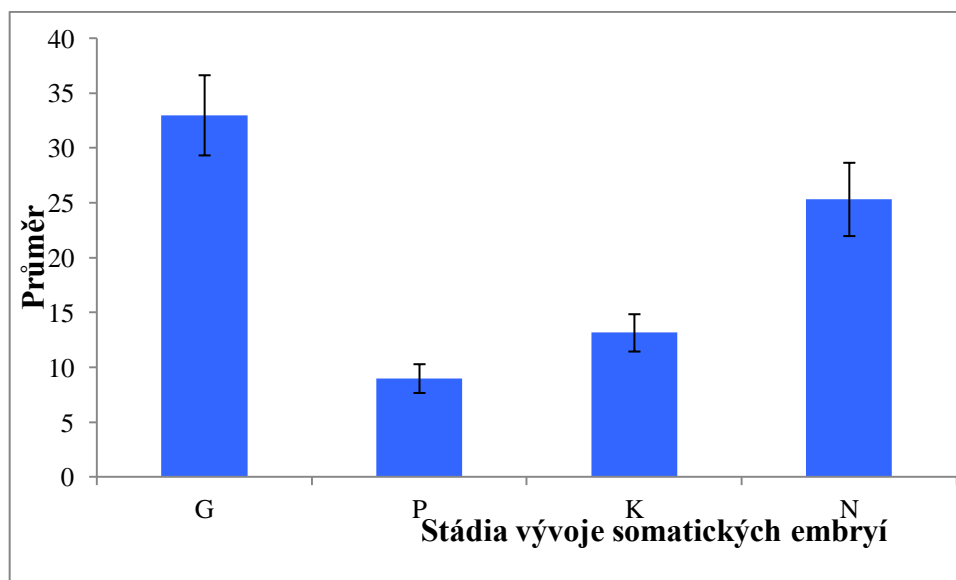


Graf 3: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur bez růstových regulátorů a rozštěpané třepačce. (LP-RL-T)

Podle Grafu 3 jsou výsledky u globulárního stádia a nektróz statisticky průkazné, u dalších kategorií neprůkazné s pravděpodobností 95%.

	G	P	K	N
1	39	39	6	16
2	26	26	13	22
3	9	9	12	52
4	33	33	22	20
5	52	52	6	19
6	39	39	20	23
PŮMĚR	33	33	13,16667	25,33333
SMODCH	13,27906	13,27906	6,175669	12,13352
CONFIDENCE	3,656511	3,656511	1,700528	3,341076

Tabulka 13: Vypočítané hodnoty z média u kultur bez růstových regulátorů a nerozštěpané na třepačce. (LP-RL-3)



Graf 4: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur bez růstových regulátorů a neroztřepané na třepačce. (LP-RL-3)

Podle *Grafu 4* jsou výsledky statisticky průkazné s pravděpodobností 95%. Je zřejmé, že vysoký podíl nekrotických embryí souvisel s tímto ošetřením.

Somatická embryogeneze smrků patří mezi neúspěšnější ze všech jehličnatých dřevin a dosáhla i na praktickou realizaci. Z jedenácti druhů smrků, u kterých byla zaznamenána regenerace cestou somatické embryogeneze do současné doby, pět taxonů je už hodnocených v klonových pokusech nebo v množitelských programech velkého rozsahu (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). K pokusu jsem si vybrala smrk ztepilý (*Picea abies*).

Pokus byl rozdělen do 2 kategorií, přičemž každá kategorie rozdělena do dalších dvou pododdělení. Jedná se o kategorie bez růstových regulátorů s roztřepáním a polovinou embryonálního kalusu; s růstovými regulátory bez roztřepání a s polovinou embryonálního kalusu.

Podkategorie LP-T byla statisticky průkazná. Napočítala jsem zde v průměrných hodnotách počet globulí 60,6, prekotydonaly 12,3, kotyledonaly 15,3 a nekrózy měly průměrnou hodnotu 26,16. Podkategorie LP-3 byla statisticky neprůkazná. Napočítala jsem zde v průměrných hodnotách počet globulí 69,16, prekotydonaly 34,66, kotyledonaly 30,83 a nekrózy měli průměrnou hodnotu 27,66. Podkategorie LP-RL-T byla statisticky neprůkazná. Napočítala jsem zde v průměrných hodnotách počet globulí

47,33, prekotydonaly 9,16, kotyledonaly 9,66 a nekrózy měli průměrnou hodnotu 15. Podkategorie LP-RL-3 byla statisticky průkazná. Napočítala jsem zde v průměrných hodnotách počet globulí 33, prekotydonaly 33, kotyledonaly 13,16 a nekrózy měli průměrnou hodnotu 25,33.

Jsou zde vysoce znatelné rozdíly mezi variantami LP a LP-RL. U vzorků LP-RL byly průměrné hodnoty počtu embryí zhruba na polovičních hodnotách, než je tak tomu u vzorků LP. Jediný případ, kde tento rozdíl nebyl natolik znatelný, byl případ srovnání LP-RL-3 s vzorky LP-T a LP-3 a to pouze v průměrných hodnotách u nekroz. Ďurkovič s paní Krajňákovou (2010) uvádějí, že možným řešením toho problému by bylo využití jednoho z mnoha šetrnějších protokolů, při kterých bylo zaznamenáno zlepšení jakéhokoli stádia somatické embryogeneze. Tyto protokoly mají za cíl vysokou produkci somatických embryí na zakládání testovacích výsadeb.

Mezi variantami -T a -3 jsou taktéž rozdíly jak u varianty LP tak i u LP-RL. U LP a LP-RL bylo vždy dosaženo vyšších průměrných hodnot ve variantách -3. Nejvíce tento rozdíl byl znatelný u prekotydonalu a kotyledonalu. Ve variantě LP-3 toto dosáhlo dvojnásobného průměru než u varianty LP-T.

Rozdíly konverze v rostliny jsou znatelné nejen mezi variantami LP a LP-RL, ale i mezi variantami -T a -3. Nyní se zaměříme na kategorie LP. Jak je patrné z *Obrázku 9* jsou u varianty LP-T nadzemní části větší oproti variantě LP-3 (*Obrázek 10*), kdežto kořenový systém byl u obou variant shodný. U varianty LP-3 byl prokázán déle trvající efekt růstu i nadzemních částí. LP-RL-T (*Obrázek 7*) se vytvořily silné, dlouhé kořeny, které se dále větvily a byla u nich zaznamenána vysoká životaschopnost. Nadzemní části dosahovaly většího vzrůstu oproti variantě LP-RL-3 (*Obrázek 8*).

Nejlepších vzhledových a růstových výsledků dosahovala varianta LP-RL-T. Naproti tomu nejhůře dopadla varianta LP-3. Výsledek varianty LP-3 byl ovlivněn přidávkem růstových regulátorů, které způsobily danou morfologickou odlišnost, varianta LP-RL-T neměla ovlivněnou optimální hormonální skladbu a díky tomu dosáhla nejlepšího morfologického členění. Z tohoto plyne, že optimálním postupem pro somatickou embryogenezi v mém pracovním postupu produkovat rostliny na médiu bez růstových regulátorů.

6 ZÁVĚR

- Konverze rostlin je nejvýraznější na *Obrázku 7* kde je zaznamenána varianta LP-RL-T. Nevýrazná byla u skupin LP, které jsou na *Obrázcích 9 a 10*, jak u varianty LP-T a LP-3. U varianty LP-RL-3 byla výraznější konverze než v případech LP-T a LP-3, ale nedosahovala tak vysoké úrovně jak varianta LP-RL-3.
- Regulátory růstu se projeví jako účinné ve smyslu zpomalení růstu a také při ochraně rostlin před nekrotizací. Rostliny, které nebyly ošetřeny regulátory růstu byly více náchylné na poškození nekrotizací, avšak dosahovaly vyšší kvality rostlinné hmoty. Rostliny neošetřené regulátory růstu dosahovali nižších průměrných hodnot vyvinutých rostlin.

7 POUŽITÁ LITERATURA

ČERMÁKOVÁ V.: *Faktory ovlivňující indukci somatické embryogeneze u jedle bělokoré (Abies alba Mill.) a smrku ztepilého (Picea abies (L.) Karst.)*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta, 2011/2012, 51 s., Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jana Krajňáková, CSc

ĎURKOVIČ J., KRAJŇÁKOVÁ J.: *Mikropropagácia drevín v podmienkach in vitro*, 88 s., TU Zvolen, 2010

JURÁSEK A., MARTINCOVÁ J.: *Pěstební postupy pro získání výsadbyschopných řízkovanců smrku ztepilého*, 24 s., VÚLHM Opočno, 2004

KADLECOVÁ M.: *Somatická embryogeneze jehličnanů: Popis strukturálního vývoje*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2010, 39 s., Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

MALÁ J., CVIKROVÁ M., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P.: *Využití somatické embryogeneze pro replikaci cenných genotypů smrku ztepilého (Picea abies (L.) KARST.)*, 15 s., Strnady, 2010

MAULEROVÁ M.: *Použití in vitro metod pro zachování genových zdrojů vybraných druhů lesních stromů*, Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, 2007, 191 s., Vedoucí disertační práce Prof. Ing. Jaroslav Kobliha, CSc

NOVÁK F.: *Velký obrazový atlas rostlin*, 614 s., Mladé letá Bratislava, 1976

PINKASOVÁ M.: *Faktory ovlivňující maturační proces somatické embryogeneze u jedle bělokoré (Abies alba(Mill.))* Brno: Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta, 2012, 48 s., Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jana Krajňáková, CSc

PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J., KOLEKTIV: *Fyziologie rostlin*, 488 s., Academia Praha, 1998

PSOTA V., ŠEBÁNEK J.: *Za tajemstvím růstu rostlin. Návody k experimentům*, 190 s., Scientia, 1999

VLAŠÍNOVÁ H.: *Transport růstových regulátorů při indukci somatických embryogeneze u smrku* Brno: Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2005, 108 s., Vedoucí doktorské disertační práce Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: *Zralé šištice a květenství ♀* (KREMER, 1995).

Obrázek 2: *Odběr rostlinného materiálu pro řízkování z matečního stromu* (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

Obrázek 3: *Řízky zapíchané do záhonu v množárně* (JURÁSEK, MARTINCOVÁ, 2004).

Obrázek 4: LP-RL-T, přesun do substrátu k aklimatizaci.

Obrázek 5: LP-T, přesun do substrátu k aklimatizaci.

Obrázek 6: LP-3, přesun do substrátu k aklimatizaci

Obrázek 7: kořenová a nadzemní část LP-RL-T

Obrázek 8: kořenová a nadzemní část LP-RL-3

Obrázek 9: kořenová a nadzemní část LP-T

Obrázek 10: kořenová a nadzemní část LP-3

Obrázek 11 : desikace LP-T

Obrázek 12 : desikace LP-3

Obrázek 16 : maturace LP-RL-3

Obrázek 14 : desikace LP-RL-3

Obrázek 13 : desikace LP-RL-T

Obrázek 15 : maturace LP-RL-T

Tabulka 1: *Účinky fytohormonů na kultivaci dřevin v podmínkách in vitro* (ĎURKOVICĚ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010).

Tabulka 2: *Složení maturačního média na 300ml, při pH 5,7 - 5,8.*

Tabulka 3: *Složení tekutého média na 300ml, při pH 5,7 - 5,8.*

Tabulka 4: *Složení zakořeňovacího média I. na 300ml, při pH 5,7 - 5,8*

Tabulka 5: Složení zakořeňovacího média II. na 300ml, při pH 5,7 - 5,8

Tabulka 6: Složení makroprvků 50 ml/l

Tabulka 7: Složení mikroprvků

Tabulka 8: Složení FeEDTA 5 ml/l

Tabulka 9: Složení vitamínů 1 ml/l

Tabulka 10: Vypočítané hodnoty z média u kultur s růstovými regulátory a roztřepané na třepačce.

Tabulka 11: Vypočítané hodnoty z média u kultur s růstovými regulátory a neroztřepané na třepačce.

Tabulka 12: Vypočítané hodnoty z média u kultur bez růstových regulátorů a roztřepané na třepačce.

Tabulka 13: Vypočítané hodnoty z média u kultur bez růstových regulátorů a neroztřepané na třepačce.

Graf 1: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur u kultur s růstovými regulátory a roztřepané na třepačce. (LP-T). Chybové úsečky zobrazují konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$

Graf 2: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur s růstovými regulátory a neroztřepané třepačce. (LP-3)

Graf 3: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur bez růstových regulátorů a roztřepané třepačce. (LP-RL-T)

Graf 4: Průměrné hodnoty zastoupení jednotlivých vývojových struktur, konfidenční interval pro pravděpodobnost $P=0,5$ u kultur bez růstových regulátorů a neroztřepané na třepačce. (LP-RL-3)

9 SEZNAM ZKRATEK

2,4-D : kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

2,4,5-T : kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová

4-Cl-IAA : kyselina 4-chlor-indolactová

4-CPA : kyselina 4-chlorfenoxyoctová

4-CPPU : 2-chloro-4-pyridyl-fenylmočovina

ABA : kyselina abscisová

ACC : kyselina 1-aminocyklopropan-s-karboxylová

AVG : aminoetoxyvinylglycin

BAP : 6-benzylaminopurin

G: globule

GA1 : giberelin 1

GA3 : kyselina giberelová

GA4 : giberelin 4

GA7 : giberelin 7

IAA : kyselina indol-3-octová

IBA : kyselina indol-3-máslová

iP : izopentenyladenin

iPA : izopentenyladenozin

K: kotyledonal

KIN : kinetin

LP-T: s růstovými regulátory, roztřepané

LP-3: s růstovými regulátory, s polovinou embryogenního kalusu

LP-RL-T: bez růstových regulátorů. roztřepané

LP-RL-3: bez růstových regulátorů, s polovinou embryogenního kalusu

N: nekrózy

NAA : kyselina 1-naftyloctová

NPA : kyselina 1-naftylftalamová

P: prekotydonal

PAA : kyselina fenyloctová

PCIB : kyselina *p*-chlorofenoxyizomaslová

TIBA : kyselina 2,3,5-trijodobenzoová

TZD: tidiazuron

Z : zeatin

ZR: zeatinribozid

10 SEZNAM PŘÍLOH



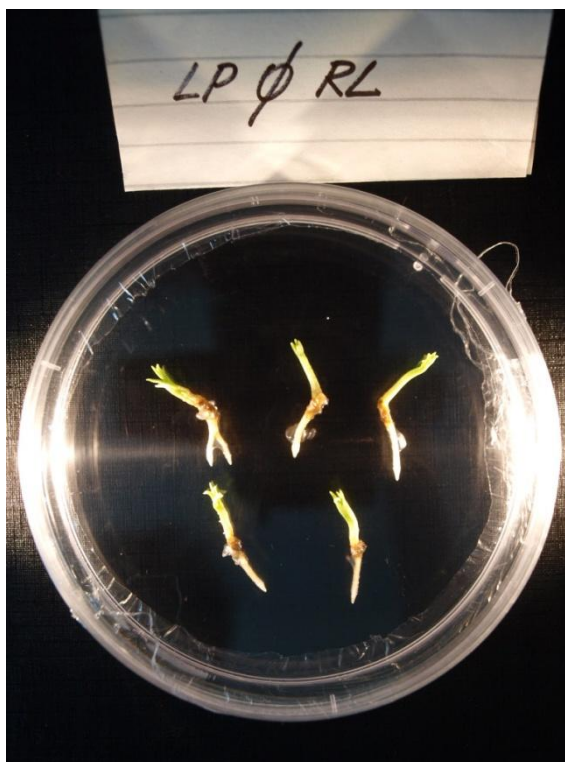
Obrázek 4: LP-RL-T, přesun do substrátu k aklimatizaci.



Obrázek 5: LP-T, přesun do substrátu k aklimatizaci.

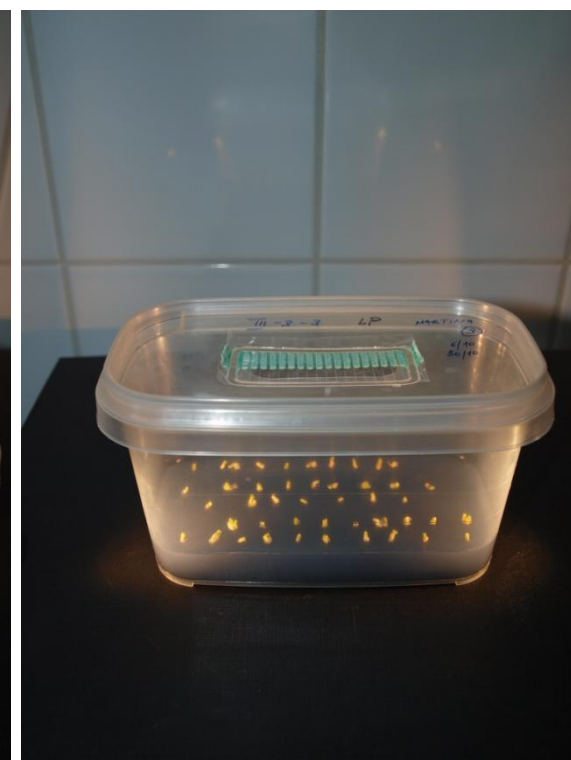


Obrázek 6: LP-3, přesun do substrátu k aklimatizaci



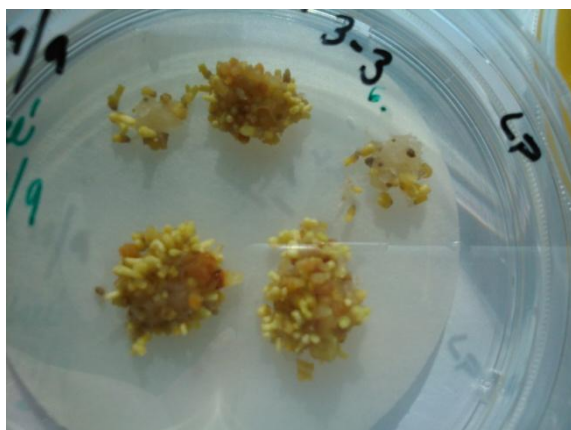
Obrázek 7: kořenová a nadzemní část LP-RL-T

Obrázek 8: kořenová a nadzemní část LP-RL-3

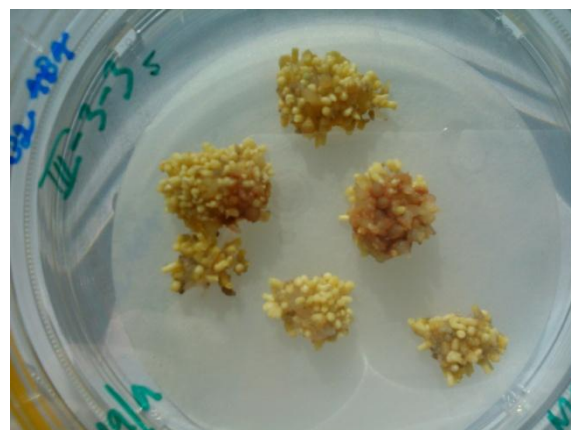


Obrázek 9: kořenová a nadzemní část LP-T

Obrázek 10: kořenová a nadzemní část LP-3



Obrázek 11 : desikace LP-T



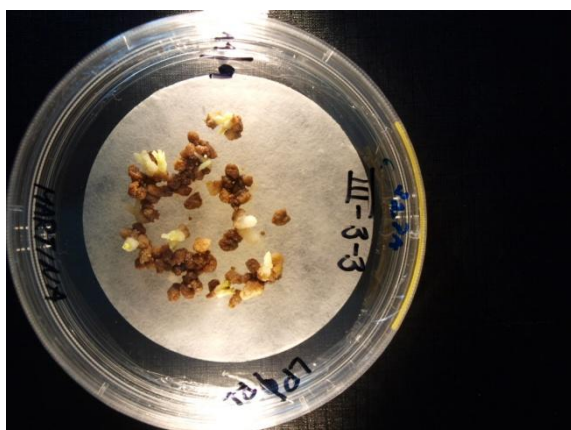
Obrázek 12 : desikace LP-3



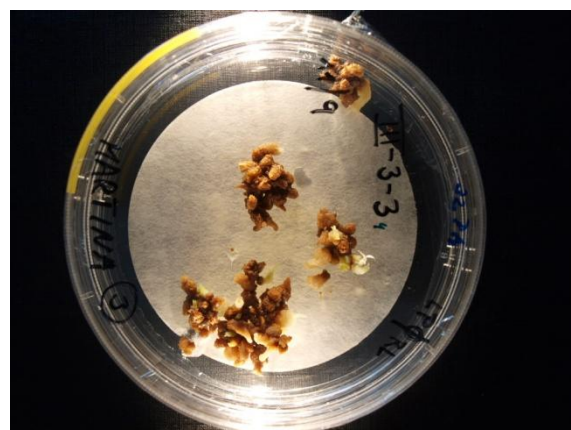
Obrázek 13 : desikace LP-RL-T



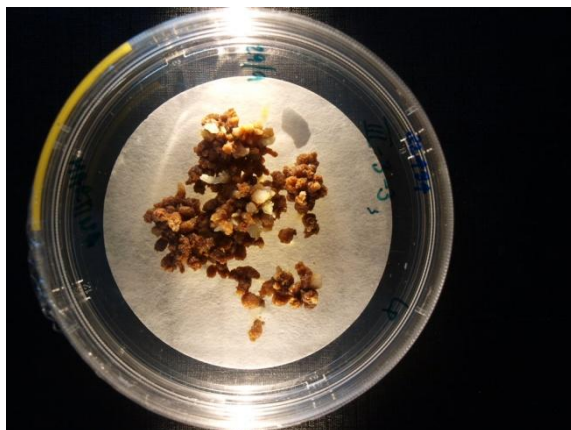
Obrázek 14 : desikace LP-RL-3



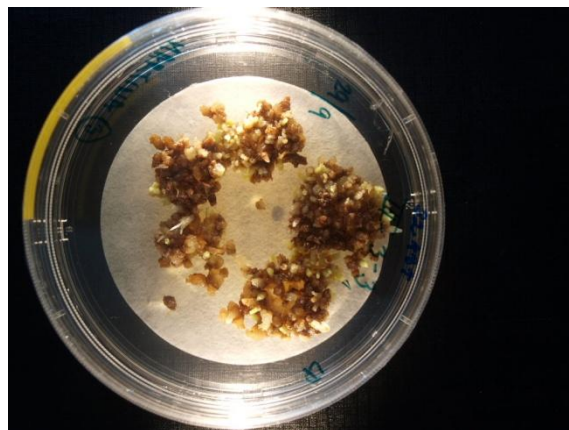
Obrázek 15 : maturace LP-RL-T



Obrázek 16 : maturace LP-RL-3



Obrázek 17 : maturace LP-T



Obrázek 18 : maturace LP-3