

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Zahradnická fakulta**

**Množení česneku kuchyňského – jarního a ozimého  
nepaličky – v podmínkách *in vitro***

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce

Dr. Ing. Helena Fišerová

Vypracoval

Václav Kozák

Lednice 2015



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Václav Kozák**  
Studijní program: Zahradnické technologie  
Obor: Zahradnictví  
Konzultant: Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Název tématu: **Množení česneku kuchyňského – jarního a ozimého nepaličáku – v podmínkách in vitro.**

## Zásady pro vypracování:

1. I když se problematikou množení česneku kuchyňského in vitro zabývá dlouhou dobu celá řada autorů, není tato metodika pro určité odrůdy dosud úspěšně dořešena. Posлуhač se seznámí se současnými podmínkami množení a pěstování rostlin v praxi a zpracuje literaturu týkající se problematiky množení česneku kuchyňského. Ze získaných údajů se posluchač pokusí najít souvislosti mezi množením in vivo a in vitro.
2. Vybere vhodné kultivační medium – či jej bude modifikovat – pro odvození primární kultury a změnou růstových regulátorů v interakci s kultivačními podmínkami vypracuje postup pro nejlepší multiplikaci rostlin v podmínkách in vitro. V závěru práce ověří stabilitu explantátové kultury pomocí DNA markerů a její zdravotní stav – bezviróznost.
3. Cílem bakalářské práce bude vytvořená a prověřená metodika pro odvození primární kultury ze stroužku a multiplikační množení v podmínkách in vitro. Výsledky by měly být základem k zdokonalení procesu výroby sadby a zvýšení počtu finálních – geneticky identických a vyrovnaných produktů odrůd nepaličáků česneku kuchyňského.

Seznam odborné literatury:

1. Kováč, J., 1995. Explantátové kultury rostlin. 1-přepracované vydání. P. 26-132.
2. Křížan a kol: Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách in vitro. Certifikovaná metodika, 2010.
3. Křížan a kol. Metodika ozdravování česneku od virů pomocí kultivace meristému a in vitro kultur. Certifikované metodika, 2010.
4. Kyung-Ho Ma a kol. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Sci. Hort.*, 122 (2009) 355–361.
5. periodika
6. Procházka, S., Šebánek, J. a kol., 1997. Regulátory rostlinného růstu, AVČR, 1 – 395.

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2012

Termín odevzdání bakalářské práce: květen 2014

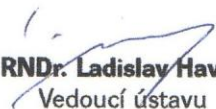
L. S.



**Václav Kozák**  
Autor práce



**Dr. Ing. Helena Fišerová**  
Vedoucí práce



**prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.**  
Vedoucí ústavu



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

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Množení česneku kuchyňského - jarního a ozimého nepaličáku - v podmínkách *in vitro*.“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom, 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 o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici, dne: .....

.....

Podpis

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí bakalářské práce Dr. Ing. Heleně Fišerové, za její rady, vstřícnost při konzultacích a odborný dohled při zpracování této práce. Velký dík patří také Ing. Tomášovi Vyhnánkovi, Ph.D. za pomoc při provádění genetické analýzy česneku.

*In memoriam* bych chtěl také poděkovat Ing. Pavlu Havránkovi, CSc., za proškolení v oblasti *in vitro* množení česneku a položení základů mému následnému bádání v tomto odvětví.

Za podporu během studia děkuji také své rodině.

## OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	7
<b>2 CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	10
3.1 Charakteristika druhu <i>Allium sativum</i> L. ....	10
3.1.1 Botanické zařazení.....	10
3.1.2 Původ a rozšíření .....	10
3.1.3 Rozdělení česneku .....	11
3.1.4 Morfologický popis .....	12
3.2 Šlechtění a pěstování česneku v ČR.....	14
3.2.1 Pěstování česneku.....	15
3.2.2 Šlechtění česneku .....	15
3.3 Význam a použití česneku .....	16
3.3.1 Obsahové látky .....	16
3.4 Nejvýznamnější choroby a škůdci .....	16
3.4.1 Choroby .....	16
3.4.2 Škůdci .....	17
3.4.3 Viry.....	17
3.5 Množení česneku v polních podmínkách .....	18
3.6 Množení česneku v podmínkách <i>in vitro</i> .....	19
3.6.1 Zakládání kultur izolací apikálního meristému .....	20
3.6.2 Zakládání kultur z nezralých květenství .....	21
3.6.3 Zakládání kultur pomocí vnitřních segmentů stroužků .....	21
3.6.4 Zakládání kultur z kořenových špiček.....	22
3.7 Kryoprezervace a kryoterapie česneku .....	22
3.8 Růstové regulátory .....	23
3.8.1 Auxiny .....	23
3.8.2 Cytokininy .....	24
3.8.3 Gibereliny .....	25
3.8.4 Kyselina abscisová .....	25
3.8.5 Etylen.....	26
3.8.6 Paclobutrazol .....	26

3.8.7 Kyselina jasmonová.....	27
3.8.8 Sacharóza.....	27
3.9 Růstové faktory .....	28
3.9.1 Hyperhydratace.....	28
3.10 Převod <i>in vitro</i> kultivovaného česneku do nesterilních podmínek .....	29
3.11 Ověřování stability DNA .....	29
3.11.1 PCR.....	29
3.11.2 SSR .....	30
3.12 Testování rostlin pomocí ELISA testů na přítomnost virů .....	30
<b>4. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>31</b>
4.1 Materiál .....	31
4.1.1 Rostlinný materiál .....	31
4.1.2 Kultivační medium .....	31
4.1.3 Vybavení laboratoře .....	32
4.2 Metodika .....	32
4.2.1 Příprava kultivačních medií.....	32
4.2.2 Příprava a povrchová sterilizace rostlinného materiálu.....	34
4.2.3 Založení primární kultury česneku ze segmentů stroužků v podmínkách <i>in vitro</i> .....	35
4.2.4 Založení primární kultury česneku z apikálního meristému v podmínkách <i>in vitro</i> .....	35
4.2.5 Průběh kultivace a průběžné hodnocení experimentu .....	36
4.2.6 Stanovení etylenu a CO <sub>2</sub> .....	38
4.2.7 Ověření stability DNA <i>in vitro</i> množených rostlin .....	39
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>44</b>
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>
<b>7 SOUHRN, RESUME A KLÍČOVÁ SLOVA .....</b>	<b>65</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>67</b>
<b>9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ .....</b>	<b>77</b>
<b>10 PŘÍLOHY.....</b>	<b>80</b>

# 1 ÚVOD

Česnek je jedna z nejdéle pěstovaných kulturních rostlin na světě. Je známo, že byl používán k léčitelským účelům již ve starověku (FRITSCH and FRIESEN, 2002). Obsahuje zdraví prospěšné sirmaté sloučeniny, cysteinsulfoxidy a především velmi silné aroma (RANDLE and LANCASTER in RABINOWITCH and CURRAH, 2002). Také soubor dalších obsažených složek, jako fruktanů, steroidních saponinů či flavonoidů, dělá z česneku jednu z nejdůležitějších léčivých rostlin, které mohou být používané jako koření, ke konzumaci za syrova nebo k dalšímu zpracování. Pro lidské zdraví je tato cibulová zelenina prospěšná především díky svým antibiotickým účinkům, příznivým kardiovaskulárním účinkem, snížením metabolických onemocnění, jakožto i protirakovinnými účinky (KEUSGEN in RABINOWITCH and CURRAH, 2002). Česnek je celosvětově používanou zeleninou, zejména pak v asijské kuchyni, v evropských zemích či v Latinské Americe (KELLER and SENULA, 2013).

Téměř všechny genotypy česneku kuchyňského ztratily schopnost tvořit semena. Skupina tzv. nepaličáků dokonce nevytváří květní stvol s květenstvím (ETOH and SIMON in RABINOWITCH and CURRAH, 2002). Naopak skupina tzv. paličáků vytváří květní stvol, který nese strboul obsahující sterilní květní poupata a pacibulky chráněné toulcem (HAVRÁNEK, 2008). Odedávna byl tedy česnek množen vegetativně (FRITSCH and FRIESEN, 2002), především pomocí stroužků nebo pacibulek (HAVRÁNEK, 2008), které jsou zásobními orgány této rostliny (KAHANE *et al.*, 1997). Vegetativní množení však nese zejména dvě hlavní nevýhody. Prvním zásadním problémem je přenos virových onemocnění a jejich přenos po celých pěstitelských oblastech česneku. Druhou nevýhodou je nízký množitelský koeficient (HAQUE *et al.*, 2000). Ten je závislý na počtu stroužků v cibuli konkrétního genotypu, tudíž je při polním pěstování získán v závislosti na odrůdě 4 – 20 násobek výsadbového materiálu (KOZÁK, 2014). Z těchto důvodů se přistoupilo k vyhledávání nejvhodnějších metod množení česneku v podmínkách *in vitro* (KELLER and SENULA, 2013).

Množením a ozdravováním česneku v podmínkách *in vitro* se zabývala již řada autorů (HAVRÁNEK, 1972; HAVRÁNEK *et al.*, 1982; HAVEL, 1982; LEPITAN and PATENA, 1992, ROKSANA *et al.*, 2002; KŘÍŽAN *et al.*, 2010). Prvním českým



autorem v tehdejší ČSSR zabývajícím se ozdravováním česneku pomocí izolace meristému a jeho kultivací v podmínkách *in vitro*, byl Ing. Pavel Havránek, CSc., který tuto problematiku studoval už od roku 1971 (KŘÍŽAN *et al.*, 2010). Jeho metoda ozdravování česneku měla však poměrně nízkou úspěšnost, která se pohybovala v rozmezí 25 % - 42 % ozdravených rostlin (HAVRÁNEK, 1972). I proto KŘÍŽAN *et al.* v roce 2010 zveřejnil originální certifikovanou metodiku ozdravování česneku pomocí kultivace meristému a *in vitro* kultur, která vznikala v průběhu let 2007 – 2010 ve spolupráci dvou výzkumných pracovišť (Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. a Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s.r.o.) (KŘÍŽAN *et al.*, 2010).

Podle aktuálně platné evropské legislativy musí být nově registrované odrůdy česneku kuchyňského ozdraveny minimálně od viru OYDV. Od vydání tohoto nařízení je hlavním problémem šlechtitelů a producentů sadby ozdravení odrůd a především následná produkce bezvirózního materiálu a to z toho důvodu, že po ozdravení rostliny dochází velmi rychle k její reinfekci (KOZÁK, 2015). Virovou infekci na ozdravené rostliny přenáší nejen mšice, ale také roztoči, jako např. vlnovník česnekový (*Aceria tulipae* Keifer) (HAVRÁNEK, 2008), takže k uchování bezvirózního rostlinného materiálu nestačí pouze množení rostlin určených k produkci sadby v technických izolátech (BERTACCINI *et al.*, 2004), ale musí docházet stále k průběžnému ozdravování konkrétní odrůdy (KOZÁK, 2015).

Tato práce se zabývá optimalizací kultivačních podmínek při *in vitro* multiplikaci dvou odrůd česneku, konkrétně podzimního genotypu s označením Emilia a jarního genotypu označeného jako 'Japo'. V obou případech se jedná o šlechtitelské materiály šlechtitelské instituce Ing. Jan Kozák, která se již přes 20 let zabývá šlechtěním česneku a produkcí sadbového materiálu (KOZÁK, 2015).

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je založení primárních kultur 2 genotypů nepaličáků česneku a následné experimentální zjištění optimální kombinace růstových regulátorů v mediu pro kultivaci a tvorbu cibulek česneku těchto genotypů v podmínkách *in vitro*. Také bude vyzkoušen vliv nízkých teplot, exogenního etylenu a CO<sub>2</sub> na multiplikaci česneku. Dále bude ověřena genetická stabilita genotypů kultivovaných v podmínkách *in vitro* pomocí PCR markerů a v neposlední řadě budou rostliny testovány pomocí ELISA na bezviróznost. Cílem experimentu je získání co největšího počtu cibulek vhodných pro převod do nesterilních podmínek, které budou geneticky identické.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Charakteristika druhu *Allium sativum* L.

Česnek kuchyňská (*Allium sativum* L.) je cibulová zelenina, jejíž konzumní částí je dělená cibule (KEUSGEN in RABINOWITCH and CURRAH, 2002). Byl pěstován již od starověku a po mnoho staletí byl používán jako koření (SRIVASTAVA *et al.*, 1995).

#### 3.1.1 Botanické zařazení

<b>Říše:</b>	<i>Plantae</i> - rostliny
<b>Podříše:</b>	<i>Tracheobionta</i> – cévnaté rostliny
<b>Oddělení:</b>	<i>Magnoliophyta</i> - krytosemenné
<b>Třída:</b>	<i>Liliopsida</i> - jednoděložné
<b>Nadřád:</b>	<i>Liliiflorae</i> - liliokvěté
<b>Řád:</b>	<i>Asparagales</i> - chřestotvaré
<b>Čeleď:</b>	<i>Alliaceae</i> - česnekovité
<b>Rod:</b>	<i>Allium</i> - česnek
<b>Druh:</b>	<i>Allium sativum</i> L. – česnek kuchyňský

(KONVIČKA, 1998; HAVRÁNEK, 2008; PETŘÍKOVÁ *et al.*, 2012)

#### 3.1.2 Původ a rozšíření

Česnek kuchyňský je používán v lidovém léčitelství už déle než 4 000 let (SRIVASTAVA *et al.*, 1995). Britský archeolog Howard Carter objevil v Egyptě 5. listopadu 1922 v hrobce faraona Tutanchámona česnek, který se tam pravděpodobně nacházel již od roku 1324 př. n. l. (HAVRÁNEK, 2008).

I z důvodu, že je česnek pěstován již od starověku, je dnes velmi obtížné s jistotou určit jejich planě rostoucí předky. S velmi vysokou pravděpodobností

je primární genetické centrum česneku v oblasti Střední Asie, konkrétně začíná na východních stepích Džungarské pánve a pokračuje na západ přes Himaláje, Afghánistán a Turecko, kolem 37. rovnoběžky severní šířky (HAVRÁNEK, 2001). Za progenitora dnes známého česneku byl dlouho považován *Allium sativum* ssp. *longicuspis*, který dodnes planě roste v západním Ťan-šanu (VVEDENSKY, 1946). Shodné typy byly však při sběrných expedicích nalezeny i na březích nad přítoky řeky Pskem i v ošské kotlině v Uzbekistánu a Kazachstánu (KOTLINSKA *et al.*, 1991) a nelze zcela vyloučit, že *Allium sativum* ssp. *longicuspis* může být jen znovu zplanělou formou již domestikovaného česneku (HAVRÁNEK, 2001). Byla dokonce zveřejněna domněnka, že by progenitorem kulturní formy česneku mohl být *Allium tuncelianum*, což je zcela jiný druh česneku, který roste planě ve středním a východním Turecku, kde pravidelně tvoří semena (MATHEW, 1996).

VAVILOV (1935) také považuje za primární genetické centrum Střední Asii. Jako sekundární genetické centrum česneku označuje Středomoří.

KONVIČKA (1998) uvádí, že v Číně byly nalezeny záznamy o česneku již z roku 1552 – 1578 př. n. l. Usuzuje také, že v Egyptě byl česnek znám již kolem roku 3000 př. n. l., ve Starověkém Řecku měl pak být česnek znám nejpozději od 10. stol. př. n. l. Marcus Porcius Cato (234 – 149 př. n. l.) uvádí česnek jako již běžně pěstovanou plodinu. Předpokládá se, že evropské kultury česnek převzaly právě od Římanů (KONVIČKA, 1998).

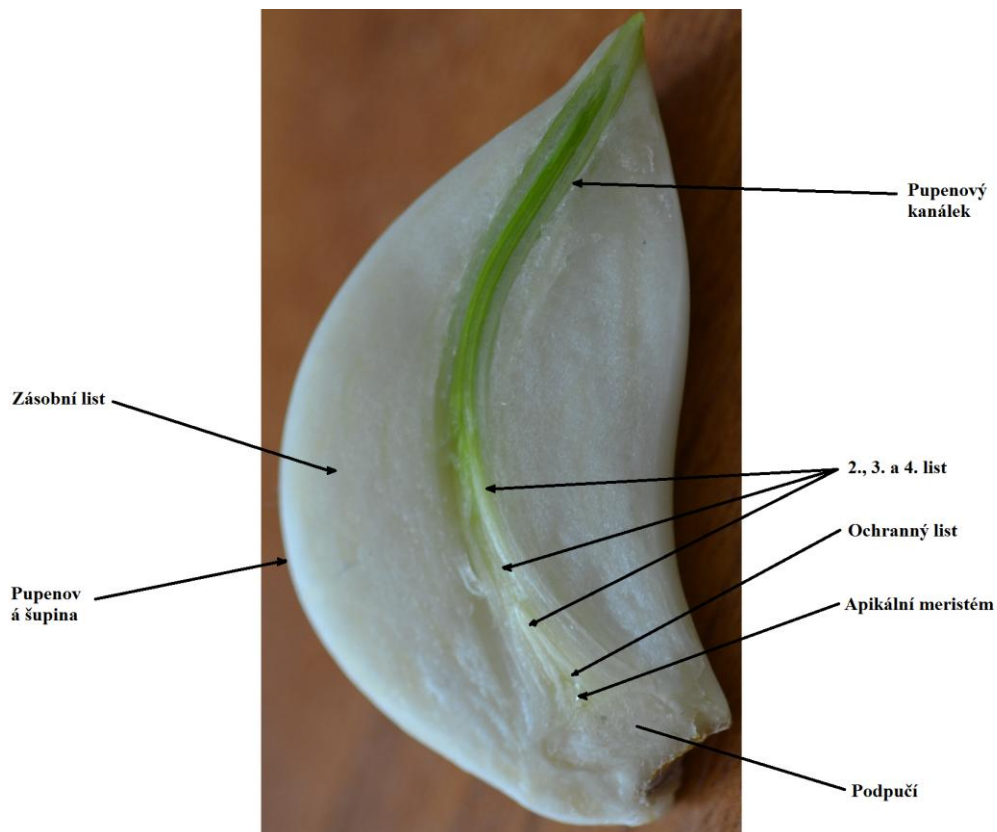
### 3.1.3 Rozdělení česneku

Základní dělení česneku je na paličáky a nepaličáky. U paličáků vyrůstá z podpučí květní stvol, který nese květenství s pacibulkami a sterilními poupaty, které je chráněno toulcem (HAVRÁNEK, 2008). Množství a velikost pacibulek záleží na konkrétním genotypu. Tato skupina česneků má obvykle méně větších stroužků. Naopak více stroužků v cibuli mají tzv. nepaličáky. Nevytvářejí květní stvol a v cibuli bývá více vnitřních stroužků. Tato skupina se dále dělí na úzkolisté nepaličáky, které jsou v našich podmínkách vhodné pro výsadbu na jaře i na podzim, a dále na širokolisté nepaličáky, které se u nás vysazují na podzim a stroužky bývají větší než u nepaličáků úzkolistých (KOZÁK, 2015).

### 3.1.4 Morfologický popis

Česnek kuchyňský se v klimatických podmínkách mírného pásma pěstuje jako jednoletá, případně dvouletá rostlina, přičemž se jedná o rostlinu vytrvalou, která každý rok vytvoří dělenou cibuli složenou ze stroužků. Z každého vzniklého stroužku může následující rok vyrůst nová rostlina. Základním rozmnožovacím orgánem česneku jsou tedy stroužky (PETŘÍKOVÁ *et al.*, 2012). Za nepříznivých klimatických podmínek, mírné zimy nebo při jarní výsadbě genotypů určených k podzimní výsadbě, může rostlina vytvořit nedělenou jednostroužkovou cibuli (KOZÁK, 2014).

Stroužky (stejně jako pacibulky) vznikly metamorfózou kolaterálních pupenů (PETŘÍKOVÁ *et al.*, 2012). Svědčí o tom jejich anatomická stavba. Stroužek je chráněn pupenovou šupinou, pod kterou se nachází zásobní list (hlavní konzumní část stroužku). Uprostřed zásobního stroužku je umístěn pupenový kanálek, kterým po vyjití stroužku z dormance prorůstají listy. V bazální části se nachází podpučí. Uprostřed vrchní části podpučí leží apikální meristém, který je chráněn nejprve primordií listů, později listy prorůstajícími pupenovým kanálkem (HAVRÁNEK, 2008).

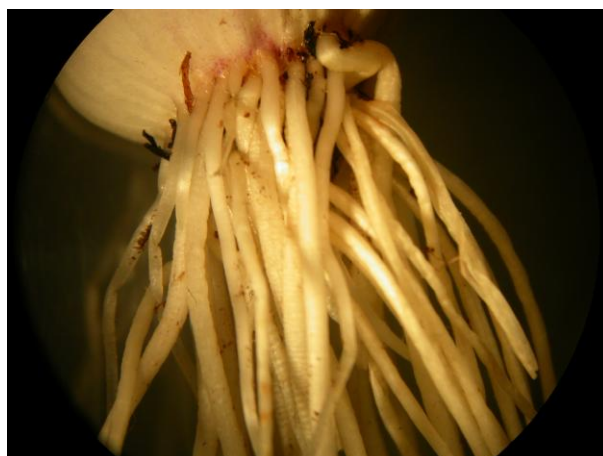


Obr. 1: Popis stavby stroužku podle Havránka (foto: V. Kozák, 19. 1. 2015)

Nejdůležitějším orgánem česneku je podpučí, což je z morfologického hlediska metamorfovaný zkrácený stonek. Podpučí je vlastně hlavním řídicím orgánem, který 260 – 270 dní v roce reaguje na teplotu, vlhkost, délku dne i na choroby a škůdce (HAVRÁNEK, 2008).

Z podpučí vyrůstají směrem dolů zatahovací kořeny. Některé kořeny mohou chvíli růst i horizontálně, než se nasměrují dolů. Kořeny jsou poměrně silné, velmi málo se větví a postrádají kořenové vlášení. Kořeny jsou obvykle bílé, někdy se starší kořeny zbarví mírně dohněda (MEREDITH, 2008). Jedna rostlina česneku mívá průměrně 40 až 60 kořenů (HAQUE *et al.*, 2000) a mohou pronikat do hloubky až 75 cm (MEREDITH, 2008). V případě, že rostlina o větší část kořenů přijde, zastaví růst a začne tvořit cibuli (HAVRÁNEK, 2008).

Z meristému umístěného uprostřed vrchní plochy podpučí vznikají primordia listů a později u paličáků vyrůstá květní stvol. Z pochev listů vzniká nepravý stonek (HAVRÁNEK, 2008). Čepel listu svírá k ose většinou tupý úhel. Délka listů může být od 15 cm do 60 cm



(MEREDITH, 2008). U paličáků jsou později listy podpírány květním stvolem. Nepaličáky květní stvol nevytvářejí, proto před sklizní dochází k poléhání listů.

Poté, co jsou vyvinuty všechny listy (duben – květen), začne u paličáků z podpučí vyrůstat květní stvol vyplněný dužninou (MEREDITH, 2008). Nejprve se vyvíjí mezi listy, následně prorůstá, zpočátku je zakroucený, během dozrávání rostliny se napřimuje. Plně vyvinutý květní stvol může mít výšku 25 cm – 200 cm, v závislosti na půdních a klimatických podmínkách i na genotypu česneku (EDWARDS, 2012; DOSTÁL, 1989). Květní lodyha je ukončena květenstvím, v jehož pojmenování je mezi autory značná nejednotnost. Objevuje se pojmenování okolík (MEREDITH, 2008; PETŘÍKOVÁ *et al.*, 2012), lichookolík (DOSTÁL, 1989; STARÝ, 1994), strboul (HAVRÁNEK, 2008) či nepravý okolík a podobně (KONVIČKA, 1998).

Květy jsou sterilní, obvykle nedojde ani k vykvetení a odumřou už květní poupata (HAVRÁNEK, 2008). Často se mylně udává, že sterilita je dána pouze sterilním pylem. Rostliny česneku mají sterilní jak samčí pohlavní orgány, tak i samičí (HAVRÁNEK, 2009 – ústní sdělení). Květenství je během zrání chráněno květním toulcem, který se po dozrání otevírá a následně odumírá.

Mezi květy se nachází pacibulky, které jsou (stejně jako stroužky) přeměněnými pupeny (HAVRÁNEK, 2008). Množství pacibulek na jedno květenství je dáno geneticky. Pohybuje se od 6 ks až do více než 1000 ks na jedno květenství (MEREDITH, 2008). Pacibulky jsou schopné dozrát i při předčasné dekapitaci květního stvolu od rostliny (HAVRÁNEK, 2008).

V případě, že není rostlina včas sklizena, pacibulky z květenství vypadávají. V půdě se také

rozkládají odumřelé suknice obalující cibuli, cibule se postupně rozpadá na jednotlivé stroužky a je-li v půdě ponechána, následující rok z každého stroužku vyrostou nová cibule (MEREDITH, 2008; ENGELAND, 1991).



Obr. 3: Pacibulky česneku 'Blanin II' a sterilní květní poupata (foto: V. Kozák, 17. 7. 2012)

### 3.2 Šlechtění a pěstování česneku v ČR

Česká republika je velmi zajímavou a významnou zemí jak pro světové producenty česneku, tak i pro výzkumné instituce. Je to dáno především tím, že je Česká republika, jakožto poměrně malý stát, na druhém místě v Evropské Unii v počtu vyšlechtěných a registrovaných odrůd (COLIN BOSWELL, 2014 – ústní sdělení). Dále pak má Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., v Olomouci největší unikátní kolekci česneků, která k 30. 11. 2011 čítala 657 genotypů této cibulové zeleniny (STAVĚLÍKOVÁ, 2012).

### 3.2.1 Pěstování česneku

V České republice je v posledních letech česnek čím dál žádanějším zbožím. Plocha osázená touto plodinou se od roku 2008 velmi rychle zvyšuje. Zatímco v roce 2008 bylo osázeno česnekem jen 45 ha, v roce 2010 to bylo už 67 ha, v roce 2012 pak 164 ha a v roce 2014 232 ha.

Cena česneku až do roku 2012 rychle stoupala. Následující roky zaznamenala pokles. V roce 2007 byla průměrná cena česneku českých zemědělských výrobců 53,6 Kč/kg. V následujícím roce se už pohybovala kolem 66,2 Kč/kg. V roce 2009 poklesla na 58,4 Kč/kg, v roce 2010 mírně stoupla na 59,3 Kč/kg. Velký cenový skok byl následující rok 2011, kdy se průměrná cena českého česneku vyšplhala na 113,9 Kč/kg a v roce 2012 dokonce na 151,8 Kč/kg. V roce 2013 pak cena poklesla na 109,6 Kč/kg a v roce 2014 se pohybovala kolem 100 Kč/kg (Situační a výhledová zpráva zelenina, MZe, 2014).

### 3.2.2 Šlechtění česneku

V Evropské Unii je registrováno v současné době 111 odrůd česneku kuchyňského. Nejvíce odrůd má registrovaných Francie, hned po ní následuje Česká republika s 22 registrovanými odrůdami (ROEU). Šlechtitelská instituce Ing. Jana Kozáka má zaregistrovaných 15 odrůd, tím se v Evropské Unii zařadila na 1. místo v počtu zaregistrovaných odrůd. V sortimentu má dokonce světově unikátní odrůdu 'Bjetin', která i přes své silné aroma nedělá metabolické problémy lidem s nemocným žlučníkem (KOZÁK, 2015).

Česká republika je velice významná i v oblasti ozdravování česneku. V roce 1969 byla v Japonsku získána první rostlina bez příznaků virového napadení. Následně se v roce 1972 to samé povedlo v tehdejší ČSSR a ve Francii (HAVRÁNEK, 2008) izolováním a kultivací meristémů v podmínkách *in vitro*. V ČSSR to bylo díky práci Ing. Pavla Havránka, CSc (HAVRÁNEK, 1972), který se jako první u nás touto problematikou zabýval. V roce 1982 ozdravil českou odrůdu 'Prim' (HAVRÁNEK, 2008).



### 3.3 Význam a použití česneku

Česnek kuchyňský je významnou rostlinou, používanou od pradávna v lidovém léčitelství. Už ve starověkém Egyptě byly známy jeho pozitivní účinky v boji proti střevním onemocněním, antiparazitární a diuretické účinky. Taktéž v Indii byly už v době starověku vyzdvihovány účinky česneku při léčení onemocnění srdce a artritických potíží (BŘEZINOVÁ, 2012).

Jeho antibakteriální a antispetické účinky jsou uznávány dodnes. Jsou především spojené s produkty hydrolýzy sirnatých silic alliinu a alicinu (DIRSCH and VOLLMAR, 2001). Byl již potvrzen i příznivý účinek česneku na metabolismus lipidů, což pomáhá při snižování vysoké hladiny cholesterolu v krvi (KEUSGEN in RABINOWITCH and CURRAH, 2002). Česnek má navíc i hypoglykemický a protinádorový efekt a velmi pozitivně působí na imunitní systém člověka (MEREDITH, 2008; EDWARDS, 2012).

#### 3.3.1 Obsahové látky

Průměrně je česnek tvořen 65 % vody. Sušina je pak tvořena sirnatými silicemi, bílkovinami, vlákninou, fruktózou, volnými aminokyselinami, dále pak i poměrně velkým množstvím saponinů, fosforu, síry, draslíku, selenu, zinku a vitamínů (BŘEZINOVÁ, 2012), především vitamíny skupiny B (MEREDITH, 2008).

### 3.4 Nejvýznamnější choroby a škůdci

#### 3.4.1 Choroby

Nejnebezpečnější chorobou česneku je bílá hniloba cibulovin (*Sclerotium cepivorum* Berk.). Prostřednictvím svých sklerocií dokáže zamořit pozemek i na 8 – 15 let. V porostech se šíří velmi rychle, na cibulích se vytváří bílý povlak s drobnými černými sklerocii a rostlina postupně odumírá (ROD *et al.*, 2005).

Dalšími chorobami je např. rzivost cibule, u které je původcem houba *Puccinia alli* (DC.), sazovitost česneku s původcem choroby *Helminthosporium alli* (Campan.), nebo poměrně hodně významná fuzáriová hniloba *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

(ROD *et al.*, 2005), u které je jedinou prevencí pozdní výsadba česneku, kdy fuzárium už není v půdě aktivní (KOZÁK, 2014).

### 3.4.2 Škůdci

Nejvýznamnějším škůdcem česneku je háďátko zhoubné (*Ditylenchus dipsacii* Kuhn.), jehož napadení se projevuje houbovatěním pletiv, praskáním podpučí, deformacemi rostlin, případně jejich úhynem (ROD *et al.*, 2005; TANCIK, 2015). Přenáší se sadbou česneku a přežívá v půdě až 20 let. Efektivní přímá ochrana proti tomuto škůdci prakticky není v ČR možná (KOZÁK, 2014).

Velmi významný je také vlnovník česnekový (*Aceria Tulipae* Keifer). Jedná se o roztoče velikosti 0,1 - 0,2 mm (ROD *et al.*, 2005). Nebezpečný je nejen přímým znehodnocováním především uskladněného česneku (PETŘÍKOVÁ *et al.*, 2012; TANCIK, 2015), ale také se nezanedbatelně podílí na přenosu viróz (BERTACCINI *et al.*, 2004; ROD *et al.*,



Obr. 4: Česnek napadený vlnovníkem (foto: V. Kozák, 17. 1. 2015)



Obr. 5: List s příznaky napadení virózami (foto: V. Kozák, 10. 6. 2014)

2005). To je velmi významné zjištění, které dokazuje, že díky jeho snadnému přenosu vzduchem během vegetace i skladování česneku, nestačí pro udržení bezvirózního šlechtitelského materiálu pouze technické izoláty zabraňující přenosu virů mšicemi a větším hmyzem (BERTACCINI *et al.*, 2004).

### 3.4.3 Viry

Česnek kuchyňský napadá celý komplex virů. Nejsledovanějším virem je žlutá zakrslost cibule – Onion yellow harf virus (OYDV), který společně s Leek yellow stripe virus (LYSV) patří do rodu *Potyvirus*.

Dalším významným rodem je *Carlavirus*, do kterého patří Garlic common latent virus (GCLV) či Shallot latent virus (SLV) (BERTACCINI *et al.*, 2004; ROD *et al.*, 2005; KOZÁK, 2014). Identifikovány byly také viry rodu *Alexvirus* (PRINGLE, 1998). Na listech napadených rostlin se objevují žluté ohraničené pruhy. U některých odrůd česneku se může vyskytovat symptomová latence (ROD, 2005). Virová onemocnění mohou snižovat výnosy o 20 – 60 % (MEREDITH, 2008). Z toho důvodu se v posledních desetiletích zvyšuje snaha ozdravovat česnek od těchto virů pomocí izolace meristémů, chemoterapie, termoterapie, kryoterapie či jejich kombinací a produkovat bezvirovní sadbu (BERTACCINI *et al.*, 2004; KOTKOVÁ *et al.*, 2012)

### 3.5 Množení česneku v polních podmínkách

Tato práce se zabývá kultivací česneku v podmínkách *in vitro*. Proto nejsou v této kapitole detailně popsány všechny agrotechnické zásahy nutné při polním pěstování, nýbrž pouze fakta, která mohou následnou kultivaci v podmínkách *in vitro* ovlivňovat, nebo faktory, které odůvodňují nutnost *in vitro* množení česneku.

Česnek se v podmínkách ČR sklízí v závislosti na odrůdě od konce června do první poloviny srpna. Těsně po sklizni jsou cibule dormantní. Síla dormance je dána jak genotypem, tak i konkrétní sezónou. V letech se silnými srážkami ke konci vegetace bývá dormance nižší (např. v roce 2013 tak nízká, že už na počátku září uskladněné cibule některých odrůd česneku začínaly při vyšší vzdušné vlhkosti rašit). Velmi rané odrůdy byly dokonce schopny vytvořit kořeny ihned po posklizňovém usušení cibulí. V jiných letech může být cibule dormantní až do příchodu dlouhodobějších nízkých teplot, až do začátku listopadu (KOZÁK, 2013 – ústní sdělení). Odbourání dormance urychlují nízké teploty, konkrétně pod 6°C po dobu trvání i několika týdnů (HAVRÁNEK, 2009 – ústní sdělení).

Nepaličáky se v polních podmínkách množí pouze pomocí stroužků. Těch však mají obvykle v cibuli více než paličáky, takže mají vyšší množitelský koeficient. Paličáky se mohou množit jak pomocí stroužků, tak i pacibulkami. Při pěstování z pacibulek však trvá 2 – 4 roky, než narostou cibule standardní velikosti (MEREDITH, 2008; KOZÁK, 2015).

Hlavním problémem vegetativního množení česneku je především přenos chorob, škůdců a virových onemocnění sadbou. Při množení česneku pacibulkami bývá

porost zdravější, i když některé choroby, škůdci a především virové infekce se i tímto způsobem množení přenášejí (viz kapitola 3.4 Nejvýznamnější choroby a škůdci) (KELLER and SENULA, 2013; KOZÁK, 2015).

Všechny české odrůdy paličáku se vysazují co nejpozději na podzim, s výjimkou odrůdy 'Mirka', kterou lze úspěšně pěstovat i z jarní výsadby. I širokolisté nepaličáky se vysazují na podzim před zamrznutím půdy, zatímco úzkolisté nepaličáky lze vysazovat jak na podzim, tak i na jaře. Při podzimní výsadbě se obvykle dosahuje vyšších výnosů. Úzkolisté nepaličáky obecně mívají déle trvající dormanci a delší skladovatelnost. Při jarní výsadbě odrůd výhradně určených k výsadbě podzimní často dochází k tomu, že narostlý česnek nevytváří dělené cibule, ale pouze cibule jednostroužkové, které navíc nedosahují uspokojivých velikostí (KOZÁK, 2014).

### 3.6 Množení česneku v podmínkách *in vitro*

K hledání způsobů pěstování česneku v podmínkách *in vitro* se přistoupilo hlavně ze dvou důvodů (HAQUE *et al.*, 2000; KELLER and SENULA, 2013).

Prvním důvodem je fakt, že při neustálém vegetativním množení česneku docházelo k zavirování sadbového materiálu a v některých případech i k následnému výraznému snížení výnosů při polním pěstování. Kvůli virovým infekcím byly např. v Japonsku zaznamenány poklesy výnosů až o 70 % (NAGAKUBO *et al.*, 1993). V Itálii byla produkce bezvirózního česneku 'Bianco Piacentino' meristémovými kulturami rozvinuta už před více než 20 lety (MARANI *et al.*, 1980; MARANI *et al.*, 1986; BERTACCINI *et al.*, 1986).

Druhým důvodem je velmi nízký množitelský koeficient (HAQUE *et al.*, 2000), zvláště u velkostroužkových genotypů.

Při *in vitro* pěstování je tedy potřeba především produkovat bezvirózní sadbový materiál pro následné dopěstování v podmínkách *in vivo*. Bylo nalezeno několik způsobů získání primární kultury pro *in vitro* kultivaci. Některé metody přímo česnek ozdravují, jiné počítají pouze s namnožením bezpatogenního materiálu získáním kultury z ověřené bezvirózní mateční rostliny.

Velkou komplikací při produkci bezvirózního sadbového materiálu je velmi rychlá reinfekce zdravých rostlin jak při polním pěstování, tak i v síťových

či skleníkových technických izolátech určených pro pěstování matečních rostlin. Je to způsobeno tím, že viry nejsou přenášeny pouze mšicemi, před kterými mohou být v technickém izolátu rostliny ochráněny, ale přenos virových infekcí může probíhat i prostřednictvím roztočů (viz kapitola Škůdci česneku), jejichž vajíčka mohou být bez problému přenášena vzduchem. Viruprosté rostliny mají vyšší výnosy 30 % – 200 % (HAVRÁNEK, 1972; BHOJWANI and COHEN, 1983; CONCI and NOME, 1991; FRITSCH and FRIESEN, 2002).

### 3.6.1 Zakládání kultur izolací apikálního meristému

Dosud nejpropracovanější metodika zakládání primárních *in vitro* kultur za účelem ozdravení česneku je pomocí izolace apikálního meristému. Touto problematikou se zabývalo již mnoho autorů. KŘÍŽAN *et al.* (2010) dokonce vypracovali detailní metodiku ozdravování česneku touto metodou. Nicméně prvním autorem u nás a jedním z prvních autorů na světě, kteří se ozdravováním česneku izolací meristému a jeho následnou kultivací v podmínkách *in vitro* zabývali, byl Ing. Pavel Havránek, CSc. (HAVRÁNEK, 1972). Jeho postupem při prosté izolaci a kultivaci apikálního meristému bylo možné získat 25 % – 42 % bezvirózních rostlin (HAVRÁNEK, 1972). Upravenou metodikou a kombinací izolace apikálního meristému s chemoterapií bylo možné získat 47 % – 89 % bezvirózního materiálu (KŘÍŽAN *et al.*, 2010). Dobré výsledky byly zaznamenány také při kombinaci meristémových kultur s termoterapií (NOVÁK, 1990; RAVNIKAR *et al.*, 1993; VERBEEK *et al.*, 1995; UCMAN *et al.*, 1998).

Při využití této metody je nejprve nutné nechat rostliny česneku narůst, což může probíhat buď v *in vivo* podmínkách (HAVRÁNEK, 2009 – ústní sdělení; KOZÁK, 2013 – ústní sdělení), nebo po předchozí povrchové sterilizaci stroužků v podmínkách *in vitro* (KŘÍŽAN *et al.*, 2010). Poté je provedena samotná izolace meristému chráněného 1 – 2 základy listů s částí podpučí a jeho následná kultivace na MS mediu (MURASHIGE and SKOOG, 1962) s růstovými regulátory, sacharózou a agarem (KŘÍŽAN *et al.*, 2010; KRAJÍČKOVÁ, 2012), případně může být využito i tekuté medium o stejném složení, avšak bez agaru, kdy izolovaný meristém je umístěn na sterilní ohnutý pásek filtračního papíru, jehož oba konce jsou ponořeny do media (HAVRÁNEK, 2009 – ústní sdělení).

Metoda izolace apikálního meristému byla využita i v druhé fázi experimentu této práce.

### **3.6.2 Zakládání kultur z nezralých květenství**

Zakládáním primárních kultur z nezralých květenství paličákových genotypů se zabýval Joachim Keller a Angelika Senula (KELLER and SENULA, 2013).

Primární explantáty se odebírají z nezralých květenství genotypů, které neztratily schopnost květenství vytvářet. Ideální termín odběru materiálu je v průběhu jara, kdy se začíná mezi listy rostlin česneku objevovat květní stvol. V té době jsou již pod ochranným toulcem zakládána primordia pacibulek, později pak květních pupenů a listů. Tento rostlinný materiál je možné použít k založení *in vitro* kultury bezprostředně po sklizení, nebo je možné celá nezralá květenství 4 – 6 týdnů skladovat v chladničce při 4 °C. Provádí se povrchová sterilizace celého květenství i se stále uzavřeným květním toulcem. Následně se ve sterilních podmínkách toulec odstraní a nařezou se malé segmenty s částí lůžka květenství a primordii pacibulek. Segmenty by měly být velikosti asi 5 mm (BHOJWANI, 1980). Lůžko květenství pak přebírá funkci podpučí (HAVRÁNEK, 2008). Segmenty se pak převádějí na klasické MS medium s obsahem růstových regulátorů vhodných pro kultivaci česneku v podmínkách *in vitro* (viz kapitola 3.8 Růstové regulátory). Vytvořené cibulky je pak možné odebírat už po 6 – 8 týdnech kultivace.

Při využití této metody nejsou známy výsledky ozdravení multiplikovaného materiálu. Nicméně i tak je vhodná k namnožení již ozdravených bezvirózních rostlin, případně k založení primární kultury pro následnou kryoprezervaci (KELLER and SENULA, 2013).

### **3.6.3 Zakládání kultur pomocí vnitřních segmentů stroužků**

Tato metoda byla využita také v první fázi našeho experimentu a přesný postup zakládání kultur touto metodou je popsán v metodice této bakalářské práce (viz kapitola 4.2.4 Založení primární kultury česneku z apikálního meristému v podmínkách *in vitro*).

Při zakládání kultur ze segmentů vnitřní části stroužků lze získat 2 – 8 primárních explantátů. Při kultivaci dochází k rychlému růstu listů a následné tvorbě

cibulek. Získané cibulky však nejsou v průběhu kultivace ozdraveny, proto je tato metoda vhodná spíše k množení již ozdraveného materiálu, případně pro experimenty vlivu růstových regulátorů a dalších faktorů na tvorbu cibulek v podmínkách *in vitro*.

#### **3.6.4 Zakládání kultur z kořenových špiček**

Teprve nedávno byla vypracována studie na zakládání *in vitro* kultur pomocí kořenových špiček. Je to zatím nejefektivnější způsob získání velkého počtu cibulek. Z jednoho stroužku lze získat průměrně 40 explantátů. Z každého explantátu je pak průměrně formováno 5,6 cibulek. Navíc kořenové špičky česneku se považují za bezvirózní (PIERIK, 1987), tudíž bezvirózními by měly být i následně vytvořené cibulky. Tuto metodu však nelze využít u všech genotypů česneku. Kultury pomocí kořenových špiček se dosud nepovedlo založit u nepaličákových odrůd. Odrůdy paličáků při založení kultury i formaci cibulek reagují proměnlivě.

Kořeny jsou povrchově sterilizovány klasickým ověřeným způsobem. Následně jsou omyty v destilované vodě a v aseptických podmínkách jsou odříznuty jejich špičky o délce 2 – 3 mm. Ty jsou přeneseny na růstové medium a následně kultivovány při teplotě 28 °C a nepřetržitém osvětlení. Listy bývají formovány přímo bez kalusových mezikultur.

Tímto způsobem je možné získat u dobře regenerujících genotypů až 295 cibulek z jednoho stroužku (HAQUE *et al.*, 2000).

#### **3.7 Kryoprezervace a kryoterapie česneku**

Kryoprezervace je metoda uchování genetického materiálu za velmi nízkých teplot (-196°C) v tekutém dusíku. V takových podmínkách mohou být rostliny uchovány mnoho let (ZÁMEČNÍK *et al.*, 2012). To je u česneku velmi přínosné, protože jinak je pro zachování genotypu nutné stálé polní pěstování (na rozdíl od semenných druhů rostlin, kde je obvykle možné semena skladovat i několik let) (STAVĚLÍKOVÁ, 2012; KELLER and SENULA, 2013). Navíc uchovávání rostlin tímto způsobem není příliš nákladné (KOTKOVÁ *et al.*, 2012). V české kryobance je takto bezpečně uchována část kolekce česneků z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i., Olomouc (STAVĚLÍKOVÁ and ZÁMEČNÍK, 2005).

Při kryoprezervaci se omezí fyzikální procesy na minimum a zastaví biochemické procesy rostliny. Při kryoprezervaci se v podstatě navodí vitrifikační stav, kdy se při velmi rychlém ochlazení vytvoří krystalky ledu, které by rostlinné buňky poškodily (ZÁMEČNÍK *et al.*, 2012). Při tomto způsobu uchovávání genetických zdrojů nehrozí riziko narušení genetické stability (KELLER and SENULA, 2013).

Kryoterapie je terapie ultranízkými teplotami. Využívá se i k ozdravení česneku, přičemž meristémy s několika základy listů jsou krátkodobě ponořeny do tekutého dusíku. Starší buňky obsahující viry jsou tímto postupem zničeny, zatímco viruprosté meristémy zpravidla přežijí (KOTKOVÁ *et al.*, 2012). Následně jsou kultivovány na růstovém mediu v podmínkách *in vitro* až do vytvoření cibulek vhodných pro převedení do nesterilních podmínek (ZÁMEČNÍK *et al.*, 2012; KELLER and SENULA, 2013).

### **3.8 Růstové regulátory**

Mezi růstové regulátory se řadí rostlinné hormony (fytohormony), které se syntetizují v rostlině i uměle vyrobené regulátory růstu, což jsou strukturní analoga fytohormonů. Každý regulátor růstu může v rostlině ovlivňovat různé fyziologické pochody. Reakce rostliny na exogenní regulátory růstu závisí na jejím vývojovém stádiu i na koncentraci dodaného regulátoru. Jeden a tentýž regulátor může na rostlinu působit jak stimulačně, tak i retardačně. V podprahových koncentracích rostlinu neovlivní vůbec. Fytohormony se dokážou prostřednictvím konjugace či oxidace rychle metabolicky inaktivovat (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003).

#### **3.8.1 Auxiny**

Auxiny se syntetizují především ve vegetačním vrcholu rostlin a v mladých vyvíjejících se listech (WHITE *et al.*, 1975). Odtud bývají bazipetálně transportovány do ostatních částí rostlin. V rostlinách stimulují buněčné dělení, diferenciaci buněk a dlouhivý růst rostliny (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003). Auxiny navíc podporují růst apikálních meristémů a indukci somatické embryogeneze (HRADILÍK, 2005).

V *in vitro* kulturách se při použití vyššího poměru auxinů ku cytokininům podpoří zakořeňování kultur. Exogenní působení auxinů a cytokininů je nutné



také při kultivaci kalusových kultur. V určité fázi vývoje *in vitro* rostlinky přestanou exogenní auxiny vyžadovat a začnou využívat vlastní syntetizované endogenní auxiny (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003).

Pro *in vitro* kultury se jako jediný nativní fytohormon používá indolyl-3-octová (IAA) (KOVÁČ, 1992). Ze synteticky vyrobených se nejčastěji používá kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina naftyloctová (NAA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), dále pak např. kyselina trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T), kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA), kyselina 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová (dicamba) a kyselina 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová (picloram) (HRADILÍK, 2005).

Každý z fytohormonů a růstových regulátorů ze skupiny auxinů má jinou účinnost. Např. 2,4-D je až 12x účinnější než IAA a NAA je 2x – 4x účinnější než IAA. Nejčastěji se do kultivačních medií pro *in vitro* kultury používají dávky 0,1 – 20 mg/l (HRADILÍK, 2005). Nicméně IAA se vzhledem ke své nestálosti v rostlinné výrobě používá méně (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

### 3.8.2 Cytokininy

Cytokininy patří mezi regulátory růstu, které nejvíce podporují dělení buněk, aktivitu meristémů, růst axilárních pupenů (HRADILÍK, 2005). Jsou to nativní nebo syntetické látky odvozené od adeninu (aminopurinu). Cytokininy, které mají v N-6 poloze izoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou, mají nejvyšší aktivitu (KAMÍNEK, 1992). Nejčastěji bývají syntetizovány v meristémech rostoucích kořenů i v dalších intenzivně rostoucích částech rostliny (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003).

Působí opačně oproti auxinům, snižují tedy apikální dominanci a omezují tvorbu kořenů. Stimulují tvorbu chlorofylu, škrobu a bílkovin. Navíc zabraňují stárnutí rostlin, které díky cytokininům zůstávají delší dobu zelené a fotosynteticky aktivní. Stimulují také tvorbu pupenů. V *in vitro* kulturách se používají k podpoře růstu prýtu, v menší koncentrace pak v kalusových kulturách i somatické embryogenezi (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003).

Z nativních cytokininů se v explantátových kulturách nejčastěji využívá zeatin. Benzylaminopurin (BAP), neboli benzyladenin (BA) byl dlouhou dobu považován za pouze syntetickou látku (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998), ale v roce 1972 byl identifikován v listech topolu (HORGAN *et al.*, 1972). Jako synteticky vyrobená

látku je pro *in vitro* kultury používán např. isopentenyladenin (2iP) či furfurylaminopurin (kinetin) (HRADILÍK, 2005).

### 3.8.3 Gibereliny

Gibereliny jsou deriváty gibanu. Jedná se o cyklické diterpeny. V současné době je známo kolem 100 giberelinu, ne všechny jsou však fyziologicky aktivní (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003).

Gibereliny především stimulují dlouhivý růst rostlin, dále podporují klíčení semen a rašení dormancích orgánů rostlin. Působí jako antagonisté kyseliny abscisové, jejich vyšší koncentrace v zásobních hlízách a cibulích odbourává dormanci a podporuje jejich rašení. Ovlivňují také kvetení rostlin a pohlaví květů (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003). Gibereliny mohou zabráňovat tvorbě cibulek (SHIBAOKA, 1990).

Do medií pro *in vitro* kultury se gibereliny přidávají za účelem podpory růstu buněčných kultur, ke stimulaci růstu zakrslých rostlin i ke stimulaci růstu kalusových kultur. Stimulační účinek však mají pouze za přítomnosti exogenních či endogenních auxinů (HRADILÍK, 2005).

Gibereliny však nejsou pro kultivaci některých druhů rostlin nepostradatelnou součástí media. Pro *in vitro* kultury se nejčastěji využívá kyselina giberelová GA<sub>3</sub> a GA<sub>7</sub> (HRADILÍK, 2005).

### 3.8.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je sekundární produkt metabolismu. Patří do skupiny seskviterpenů. Bývá syntetizována především v mladých pletivech rostlin štěpením karotenoidního prekursoru. Její vyšší koncentrace se vyskytuje v dormancích orgánech a má vliv na hloubku dormance (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003). Působí antagonisticky vůči auxinům a giberelinům (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

Nebývá příliš často přidávána do media pro explantátové kultury. Poměrně významně zpomaluje růst rostlin. Nicméně je známo její stimulační působení při tuberizaci, indukci somatické embryogeneze, indukci kvetení i retardace explantátu

a navození dormance. (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; HRADILÍK, 2005). Kyselina abscisová urychluje stárnutí pletiv a vyvolává uzavírání průduchů rostlin (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003). Rostlinám pomáhá při obraně vůči stresům, případně na stresy se adaptovat (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

### 3.8.5 Etylen

Jedná se o jediný plynný fytohormon. Je to nejjednodušší uhlovodík s jednou dvojnou vazbou. Stanovuje se pomocí plynové chromatografie. V rostlinách etylen vzniká z metioninu a jeho prekursorem je 1-aminocyklopropan-1- karboxylová kyselina (ACC). ACC je pak oxidována na oxid uhličitý, kyanovodík a etylen (KENDE, 1993) V cytoplazmě je etylen jen velmi málo rozpustný, proto je jeho koncentrace v buňkách jen nízká. Difunduje z cytoplasmy do intercelulár a poté do okolní atmosféry (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998; LUŠTINEC a ŽÁRSKÝ, 2003).

Etylen stimuluje radiální růst, naopak inhibuje růst dlouhivý. Mění rovinu buněčného dělení a reorientuje mikrotubuly a celulózové mikrofibrily, což mění podélná růst na růst radiální. Etylen navíc autokatalysy zvyšuje svoji vlastní syntézu. Také podporuje tvorbu enzymů, které štěpí polysacharidové složky buněčných stěn. Etylen, stejně jako kyselina abscisová, způsobuje stárnutí pletiv (LUŠTINEC and ŽÁRSKÝ, 2003). Produkce etylenu rostlinou se zvyšuje ve stresových podmínkách (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

### 3.8.6 Paclobutrazol

Paclobutrazol (PP 333) zpomaluje růst rostlin, který se v rostlinné výrobě používá i jako retardant s velmi širokým spektrem působení. Brzdí biosyntézu giberelinů (KUTINA, 1988), inhibuje růst internodií a podporuje růst kořenů. Navíc zvyšuje odolnost rostlin vůči stresům způsobeným suchem i mrazem (CHANEY *et al.*, 1996).

Paclobutrazol také pozitivně ovlivňuje multiplikaci *in vitro* kultivovaných rostlin a snižuje citlivost rostlin na stresy při převodu z *in vitro* podmínek do podmínek *in vivo* (ONDRUŠIKOVÁ *et al.*, 2006).

### 3.8.7 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová a její metylestery a glukózaestery nejsou řazeny mezi fytohormony, protože jejich koncentrace je vyšší (až desítky mikrogramů na gram suché hmoty rostliny) než u ostatních fytohormonů (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

Kyselina jasmonová je schopna narušit kortikální mikrotubuly buněk (ABE *et al.*, 1991). Je syntetizována v listech rostlin (ROSSI JAUME *et al.*, 1997) a následně bazipetálně transportována floémem (RYAN, 1992). Vliv na rostliny má především inhibiční, brzdí růst kalusu, urychluje stárnutí listů, iniciuje zakládání kořenů, ale následně brzdí jejich růst (MACHÁČKOVÁ in PROCHÁZKA, 1998).

Sledován a popsán byl vliv kyseliny jasmonové na tuberizaci bramboru (KODA *et al.*, 1988; KODA and OKASAWA, 1988). U *in vitro* kultivace česneku tvorbu cibulek podpoří koncentrace 1 mg/l kyseliny jasmonové v kultivačním mediu (ROSSI JAUME *et al.*, 1997).

### 3.8.8 Sacharóza

Sacharóza v mediu má několik důležitých funkcí. Nejen že sehrává důležitou funkci v heterotrofní výživě explantátů, má vliv i na další děje ovlivňující růst kultivovaných rostlin. Vyšší koncentrace sacharózy v mediu může být zodpovědná za osmotický stres kultivované rostliny (PARTHIER, 1991). Navíc vyšší koncentrace sacharózy ovlivňuje tvorbu CO<sub>2</sub>, což může pozitivně nebo negativně v podmínkách *in vitro* ovlivňovat tuberizaci či tvorbu cibulek (HONJO *et al.*, 1988). U sněženek množených *in vitro* byl zaznamenán příznivý efekt koncentrace sacharózy v mediu 60 g/l v kombinaci s aktivním uhlím (STAIKIDOU *et al.*, 2006). Na tvorbu hlíz u brambor měla nejlepší vliv koncentrace 80 g/l, která pozitivně ovlivňovala velikost hlíz, naopak inhibovala růst prýtu (XU *et al.*, 1998). Koncentrace sacharózy však může mít vliv na výskyt hyperhydratace pletiv explantátů, což může vést až k úhynu kultivovaných rostlin (NOVÁK, 1990; WU *et al.*, 2009).

### 3.9 Růstové faktory

Působení faktorů ovlivňujících růst rostlin v podmínkách *in vitro* je odlišné od působení faktorů na polní kultury. U rostlin česneku je tvorba cibulí vyvolána exogenními stimuly, jako je délka dne a teplota (MANN and MINGES, 1958; RACCA *et al.*, 1981). Tyto stimuly mohou vyvolat syntézu hormonů, které tvorbu cibulí indukují (ROSSI JAUME *et al.*, 1997).

Tvorba cibulí v polních podmínkách byla léta studována agronomy a rostlinnými fyziology (HEATH, 1945; MANN, 1952), ale poměrně málo bylo publikováno o vlivu růstových faktorů na *in vitro* kultury (KAHANE *et al.*, 1992b; NAGAKUBO *et al.*, 1993, KAHANE *et al.*, 1997).

Nejčastěji využívanou teplotou pro kultivaci česneku je 21 °C – 25 °C (TAKAGI and QU, 1995; ROSSI JAUME *et al.*, 1997; KELLER and SENULA, 2013). Pro některé genotypy česneku bylo vhodné předšetření nízkými teplotami kolem 4°C (TAKAGI and QU, 1995; KAHANE *et al.*, 1997). Fišerová (2012) uvádí i vliv nízkých teplot při kultivaci v podmínkách *in vitro* na tvorbu etylenu rostlinami česneku (FIŠEROVÁ *et al.*, 2012).

Studován byl i vliv fotoperiody na formaci cibulek multiplikovaných rostlin (TAKAGI and QU, 1995; KAHANE *et al.*, 1997; HAQUE *et al.*, 2000). Zatímco pro kultivaci česneku zakládané primární kultury z kořenových špiček jsou vhodné vyšší teploty (28 °C) v kombinaci s nepřetržitým osvětlením (KAHANE *et al.*, 2000), pro ostatní kultury česneku se nejlépe osvědčila fotoperioda 16 hod. světla a 8 hod. tmy (TAKAGI and QU, 1995; KAHANE *et al.*, 1997).

Pro růst prýtu a tvorbu cibulek byly publikovány dobré výsledky pod jakýmkoliv testovaném osvětlení s výjimkou PG lamp (speciální lampy pro pěstování rostlin), které tyto procesy poněkud inhibovaly. Lepší výsledky byly při kultivaci pod lampami obsahujícími infračervenou složku světla (TAKAGI and QU, 1995).

#### 3.9.1 Hyperhydratace

Při kultivaci v podmínkách *in vitro* se u některých odrůd často objevuje hyperhydratace pletiv kultivovaných rostlin. Hyperhydratace je degenerativní stav, kdy dochází k vyplnění mezibuněčných prostor vodou a rostliny získávají sklovitý

vzhled. Faktorů vedoucích k hyperhydrataci pletiv může být několik. Příčinou může být koncentrace osmotických látek (sacharózy) v mediu, koncentrace cytokininů, vysoká vzdušná vlhkost v kultivační nádobě, koncentrace agaru i délka chladného skladování česneku před kultivací. Hyperhydrataci může redukovat zvyšování poměru dusičnanu draselného ku chloridu amonnému. Doporučuje se i ochlazování dna kultivačních nádob či polic, na kterých jsou rostliny kultivovány. Silně hyperhydratované rostliny obvykle není možné zachránit a jsou určeny k likvidaci. Rostliny vykazující pouze slabší známky hydratace je dobré co nejvíce zakrátit a odstranit pletiva vykazující zavodnění. V případě, že jsou po tomto zásahu rostliny častěji přenášeny na nové medium, vykazuje poté většina rostlin normální růst a vývoj. Některé odrůdy trpí v podmínkách *in vitro* hyperhydratací více, u jiných odrůd může docházet k tomuto problému zřídka (NOVÁK, 1990; NAGAKUBO *et al.*, 1993; SCHLOUPF *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2009; KŘÍŽAN *et al.*, 2010; KELLER and SENULA, 2013).

### **3.10 Převod *in vitro* kultivovaného česneku do nesterilních podmínek**

Zakořenělé rostliny z explantátových kultur špatně snáší převod do nesterilních podmínek. Proto se pro převod do podmínek *in vivo* používají pouze v *in vitro* podmínkách vytvořené cibulky, které toto přenesení snáší poměrně dobře. Úspěšnost převodu však ovlivňují použité regulátory růstu při kultivaci *in vitro*. V některých případech jsou cibulky bez dormance a mohou se ihned přenést do substrátu. Důležité je následné důkladné zavlažení roztokem s 0,15 % Previcuru. Další dopěstování by mělo probíhat při 18 – 20°C (HAQUE *et al.*, 2000; KELLER and SENULA, 2013).

### **3.11 Ověřování stability DNA**

#### **3.11.1 PCR**

Za metodu PCR (Polymerázová řetězcová reakce – Polymerase Chain Reaction), která byla vyvinuta v roce 1983, získal její autor Kary Mullis o deset let později Nobelovu cenu za chemii. Metoda PCR byla teoreticky popsána už v roce 1971, ovšem až Kary Mullis ji dokázal realizovat a popsat praktický postup.

Jedná se o metodu fungující na principu syntézy nukleových kyselin v podmínkách *in vitro*, při které dochází k replikaci určitých segmentů templátové

DNA. Metoda PCR je natolik citlivá, že dokáže ve vzorku odhalit i jedinou molekulu DNA (TELLIER *et al.*, 2003; BARÁNKOVÁ, 2012).

### **3.11.2 SSR**

SSR je zkratka anglického názvu molekulární metody Simple Sequence Repeats. Tato metoda se často využívá k získání DNA profilu či k vytvoření genetických map. Pracuje na principu analýzy mikrosatelitních sekvencí tvořených repeticemi krátkých DNA sekvencí (1 – 6 nukleotidů). Obvykle bývá celková délka mikrosatelitu 100pb. Vyznačuje se velmi vysokým stupněm polymorfismu markerů (TAUTZ *et al.*, 1986). V určitém SSR lokusu lze počet opakování repetice snadno stanovit pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) při využití specifických primerů (POWELL *et al.*, 1996).

### **3.12 Testování rostlin pomocí ELISA testů na přítomnost virů**

ELISA testy jsou jednou z metod pro testování přítomnosti virových onemocnění organismů. Název metody ELISA vychází z anglického názvu Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Tato metoda funguje na principu imunoenzymatické reakce, kdy jsou použita specifická séra pro detekci daného viru. Výsledky testů se hodnotí podle zbarvení vzorku na destičce. V některých případech, kdy dochází k výraznému zbarvení pozitivních vzorků, stačí pouhá vizuální kontrola. Pokud však dochází pouze k mírnému zbarvení, nebo je důležité získat velmi spolehlivé výsledky, používá se k hodnocení spektrofotometrie (RACANIELLO, 2010; ELISA for Virus Test, 2004-2015).

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Pro experiment byly využity 2 odrůdy česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.). V obou případech se jednalo o šlechtitelský materiál Ing. Jana Kozáka. Po sklizni byly cibule skladovány při venkovní teplotě po dobu 2 měsíců.

První genotyp je označen pracovním názvem Emilia. Jedná se o podzimní širokolistý nepaličák s 12 stroužky v cibuli. Cibule má fialovou kresbu. V polních podmínkách se sklízí na začátku července.

Druhý genotyp je označen názvem 'Japo'. Je to jeden z klonů původního 'Japa' vyšlechtěného Jaroslavem Pourem. Chybou v udržovacím šlechtění tehdy došlo k výraznému zmenšení cibulí a odrůda se



tímto znehodnotila, až byla postupně zrušena. Klon s názvem 'Japo' má cibule standardní velikosti. V cibuli se nachází 8 – 12 stroužků. Suknice cibule jsou bíle zbarveny a sklizeň tohoto klonu je v polních podmínkách začátkem srpna. Jedná se o úzkolistý jarní nepaličák vhodný k výsadbě na podzim i na jaře.

Obr. 6: Cibule česneku s označením Emilia (foto: V. Kozák, 25. 11. 2014)

#### 4.1.2 Kultivační medium

Základním kultivačním mediem pro primární kulturu bylo medium MS (Murashige and Skoog medium) (MURASHIGE, SKOOG, 1962) doplněné o 0,2 mg/l 1-naftyloctové kyseliny (NAA), 0,5 mg/l dimetylalylaminopurinu (iP), 30 g/l sacharózy a 8 g/l agaru. Další media pro experiment obsahovala buď kyselinu abscisovou (ABA), či paclobutrazol (PP 333), kyselinu giberelovou ( $GA_3$ ), benzylaminopurin (BAP), kyselinu 2-chloretylfosfonovou (CEPA) a variantu s vyšší koncentrací sacharózy (viz tab. 1 a 2).



### 4.1.3 Vybavení laboratoře

Experiment byl v první fázi prováděn v explantátové laboratoři na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně, na Ústavu biologie rostlin. Laboratoř se skládá z místnosti pro přípravu medií, vybavenou chladničkami s chemikáliemi a růstovými regulátory, laboratorním sklem, míchačkou, třepačkou, analytickými váhami, pH metrem a dalšími přístroji potřebnými pro přípravu medií. Media byla sterilizována ve zvláštní místnosti vybavené horkovzdušnými sterilizátory, autoklávy, myčkou a přístrojem pro destilaci a demineralizaci vody. Samotné množení bylo prováděno v polosterilní místnosti vybavené klimatizací, sterilizační UV-C zářivkou a laminárními boxy (flow boxy). Kultivace probíhala v klimatizované kultivační místnosti vybavené osvětlenými regály se skleněnými policemi či chladničkou s osvětlením ke kultivaci rostlin v chladnu.

Druhá fáze experimentu byla realizována v *in vitro* vlastní laboratoři na šlechtitelském pracovišti Ing. Jana Kozáka v Poběžovicích u Holic. I tato laboratoř byla vybavena přístroji pro vaření a sterilizaci medií, flow boxem, klimatizací, čističkou vzduchu, germicidními UV-C zářivkami a osvětlenými kultivačními regály se skleněnými policemi a zářivkami Narva BIO vital (spektrálním složením odpovídá přirozenému dennímu světlu, bar. teplota 5800 K, odstín 958) a Narva Lumoflor (speciální trubice pro pěstování rostlin, odstín 077).

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Příprava kultivačních medií

Pro experiment byla použita MS media, která byla v několika variantách doplněna různými koncentracemi růstových regulátorů či sacharózy.

V 2litrové Erlen Mayerově baňce byl rozvařen v 0,5 litru destilované vody agar (8 g/l). Ve zvláštní kádince pak byla v cca 0,3 l destilované vody rozmíchána sacharóza (30 g/l), komerční práškové MS medium (4,4105 g/l - Duchefa) a pro danou variantu příslušné množství růstových regulátorů (NAA, 2iP, GA3, BAP, PP 333, ABA)- viz tabulka, které byly předem rozpuštěny v kapce etanolu nebo KOH (podle konkrétního regulátoru). Poté bylo pH metrem změřeno pH a upraveno na hodnotu 5,8 – 5,9 pomocí 0,1M NaOH nebo 0,1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Medium bylo sterilizováno v autoklávu při 121°C již

v kultivačních skleničkách uzavřených víčkem se septem umožňujícím odběr plynu z nádob pro stanovení produkovaného CO<sub>2</sub> a etylenu rostlinami.

Pro založení primární kultury bylo využito MS medium doplněné o 30 g/l sacharózy, 8 g/l agaru, 0,2 mg/l NAA a 0,5 mg/l 2iP.

V druhé fázi pokusu v laboratoři v Poběžovicích u Holic bylo pro založení kultury pomocí izolovaného meristému využito MS medium s 30 g/l sacharózy, 6 g/l agaru, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP a 0,5 mg/l GA<sub>3</sub>.

Pro podporu formace cibulek byly vytvořeny další varianty medií, kde základní media pro založení primární kultury (viz výše) byla doplněna o některý z růstových regulátorů (viz tab. 1 a 2).

Tab. 1: Varianty složení MS medií pro kultury založené ze segmentů stroužků

	Auxiny	cytokininy	sacharóza	doplňkový r. regulátor
1. Varianta K	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	30 g/l	---
2. Varianty	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	30 g/l	0,2 mg/l ABA
3. Varianta	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	30 g/l	0,5 mg/l PP 333
4. Varianta	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	80 g/l	---
5. Varianta	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	30 g/l	CEPA

CEPA – pro zvýšení exogenního etylenu byla do kultivační nádoby umístěna malá skleněná kádinka s 1 ml 1% flordimexu - účinná látka CEPA (2-chlorethylfosfonová kyselina), do které byly umístěny naklíčené obilky ječmene, které 2-chlorethylfosfonovou kyselinu biologicky rozkládaly na etylen (FIŠEROVÁ *et al.*, 2012).



Obr. 7: Skleněná kádinka s 1 ml 1% flordimexu a naklíčenými obilkami umístěná uvnitř kultivační nádoby (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)

Tab. 2: Varianty složení MS medií pro kultury založené z meristému

označení media	auxiny	cytokininy	gibereliny	sacharóza	Doplňkový r. regulátor
<b>ZM1</b>	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP	0,5 mg/l GA <sub>3</sub>	30 g/l	---
<b>ZM2</b>	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l 2iP	---	30 g/l	---
<b>ABA</b>	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP	0,5 mg/l GA <sub>3</sub>	30 g/l	0,2 mg/l ABA
<b>PP333</b>	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP	0,5 mg/l GA <sub>3</sub>	30 g/l	0,5 mg/l PP 333
<b>Sach.</b>	0,2 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP	0,5 mg/l GA <sub>3</sub>	80 g/l	

#### 4.2.2 Příprava a povrchová sterilizace rostlinného materiálu

Cibule česneku byly rozdruženy na jednotlivé stroužky, které byly následně zbaveny vrchní ochranné šupiny. Byly vybrány pouze vizuálně zdravé stroužky bez viditelného napadení chorobami či škůdci. Ty byly omyty ve vlažné vodě se saponátem, a poté v kádince ve flow boxu sterilizovány po dobu 13 minut v 0,2% chloridu rtuťnatém. Po třináctiminutové povrchové sterilizaci byly stroužky přeneseny

do kádinky se sterilní destilovanou vodou, která byla vždy po 10 minutách 3x vyměněna.

#### **4.2.3 Založení primární kultury česneku ze segmentů stroužků v podmínkách *in vitro***

Po dokončení povrchové sterilizace a omytí zbytků sterilizačního roztoku z rostlinného materiálu, byly stroužky připraveny k založení primární kultury. Celý stroužek byl ve flow boxu přenesen pinzetou z kádinky se sterilní destilovanou vodou na Petriho misku, kde byl skalpelem podélným řezem rozpůlen. Byla odříznuta velká část podpučí tak, aby na stroužku zůstala



jen jeho maximálně 0,5 mm silná vrstva, která nesla

Obr. 8: Odřezávání segmentu stroužku určeného pro založení nové *in vitro* kultury (foto: V. Kozák, 26. 11. 2013)

zakládané listy, primordia listů a apikální meristém. Následně byla vnitřní část stroužku vyňata z pupenového žlábků tak, že byl odstraněn silný vrchní zdužnatělý zásobní list. V případě, že byl získaný segment dostatečně velký, byl ještě následně podélným řezem rozpůlen. Tímto byly z každého stroužku získány 2 – 4 segmenty, které byly ve sterilních podmínkách přeneseny do kultivačních nádob se základním médiem MS s 30 g/l sacharózy, 8 g/l agaru, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l 2iP a nádoby byly uzavřeny víčkem a popsány. Poté byly umístěny v kultivační místnosti pod zdroj světla se 16 hod. světelnou periodou.

#### **4.2.4 Založení primární kultury česneku z apikálního meristému v podmínkách *in vitro***

V laboratoři šlechtitele Ing. Jana Kozáka byly primární kultury zakládány z apikálního meristému, neboť jsme při průběžném hodnocení prvního experimentu došli k názoru, že vliv na výsledek pokusu může mít i velikost segmentu stroužku

česneku použitého pro založení primární kultury či přítomnost apikálního meristému v segmentu.

Cibule česneku byla rozdělena na stroužky, stroužky byly zbaveny ochranné šupiny, dále kultivovány v truhlících s perlitem a zavlažované roztokem (HAVRÁNEK, ústní sdělení) s 25 g/l ribavirinu (KŘÍŽAN *et al.*, 2010). Po 3 – 4týdenní kultivaci byly narostlé rostliny česneku z truhlíku vyňaty, z kořenů byl odstraněn perlit a následně byly těsně nad stroužkem odstraněny narostlé listy. Dále byly odříznuty kořeny i s částí podpučí a byl odstraněn zásobní list stroužku. Zbylá přibližně 2 - 3 cm dlouhá část rostliny obsahující velkou část podpučí nesoucí zbylé části listů a především apikální meristém byla opláchnuta vodou se saponátem a sterilizována v kádince v 20% nebo 25% Savu. Po 20minutové sterilizaci byla tato část rostliny ve sterilních podmínkách ve flow boxu opláchnuta v kádince se sterilní destilovanou vodou a poté po dobu 1 minuty dezinfikována v další kádince se 70% etanolem (KRAJÍČKOVÁ, 2012) a 3krát opláchnut ve sterilní destilované vodě.

Takto povrchově sterilizovaný segment předpěstované rostliny česneku byl přenesen na sterilní Petriho misku, kde byl pomocí skalpelu zakrácen na délku cca 1 cm, a poté čtyřmi podélnými řezy mimo osu upraven tak, že vznikl nedokonalý krychlovitý tvar podpučí, což umožnilo pohodlné uchopení segmentu pinzetou za podpučí. Pomocí skalpelu byly odstraňovány části listů, až na podpučí zůstal obnažený meristém krytý 1 – 2 základy listů. Pod binokulární lupou byl meristém s částí podpučí a ponechanými základy listů odříznut od zbytku podpučí. Poté byl meristém zahnutou jehlou přenesen na základní MS medium s 30 g/l sacharózy, 6 g/l agaru, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP a 0,5 g/l GA3 do malých zkumavek velikosti 7,5 x 0,9 cm s 1,5 ml media. Zkumavky byly uzavřeny klasickou potravinářskou fólií, popsány a umístěny do kultivačních regálů osvětlených speciálními zářivkami pro pěstování rostlin (Narva BIO vital a Narva Lumiflor).

#### **4.2.5 Průběh kultivace a průběžné hodnocení experimentu**

Rostliny česneku byly kultivovány v Brně v kultivační místnosti s teplotou 23 °C a fotoperiodou 16 hod. světlo, 8 hod. tma. Část experimentu byla zpočátku umístěna do chladničky se stálým světlem a teplotou 11 °C a do chladničky se stejnou teplotou bez osvětlení (FIŠEROVÁ *et al.*, 2012).

Rostliny byly během kultivace kontrolovány, kultivační nádoby s kontaminacemi byly vyřazovány a byla vytvářena průběžná fotodokumentace. Každé 2 – 3 měsíce byly rostliny přepasážovány do nových kultivačních nádobek, přičemž byla střídána media s různým obsahem regulátorů růstu případně media s vyšším obsahem sacharózy, byla měřena koncentrace CO<sub>2</sub> a etylenu v kultivačních nádobkách. Před každým pasážováním bylo provedeno průběžné hodnocení formace cibulek na daném mediu.

Vzhledem k tomu, že u obou testovaných genotypů česneku ve všech variantách medií velmi často docházelo k hyperhydrataci pletiv a rostliny předčasně odumíraly dříve, než mohla být otestována životaschopnost vytvořených cibulek po převodu do podmínek *in vivo*, bylo základní médium pro další experiment, jež probíhal v laboratoři šlechtitelské instituce Ing. Jana Kozáka, upraveno. K základnímu MS mediu, jež obsahovalo NAA, BAP, a GA3, byly přidávány v různých variantách stejné koncentrace PP 333, ABA i sacharózy, jako v předešlé fázi pokusu. Nicméně první fáze pokusu dobře posloužila k posouzení vlivu exogenního CO<sub>2</sub> a etylenu na iniciaci tvorby cibulek. Výsledky tohoto experimentu jsou připraveny k publikaci – Vliv genotypu česneku na tvorbu cibulí v podmínkách *in vitro* (FIŠEROVÁ *et al.*, 201x).

V druhé fázi pokusu, jež probíhal v laboratoři již výše zmíněného pracoviště, byly po založení primární kultury rostliny česneku přeneseny do větších zkumavek (16 cm x 1,6 cm) s 6,5 ml různých variant medií. Kultivační zkumavky byly umístěny do regálů



Obr. 9: Explantátová laboratoř šlechtitelské instituce Ing. Jana Kozáka (foto: V. Kozák, 23. 11. 2014)

se skleněnými policemi o rozměrech 136 cm x 48 cm. Nad každou polici ve výšce 6 cm nad vyššími zkumavkami (a 14,5 cm nad nižšími zkumavkami pro založení kultury) byly umístěny dvě 36 W zářivkové trubice délky 120 cm ve vzdálenosti 28 cm od sebe. Každá z trubic měla jiné spektrální složení. Jednalo se o trubice Narva BIO vital (spektrum je podobné dennímu světlu, v porovnání s klasickými trubicemi obsahuje více červeného a modrého záření, dále pak záření UVA a UVB, zářivky jsou vhodné

pro pěstování rostlin, odstín světla je 958, bar. teplota 5800 K) a o trubice Narva Lumoflor (zářivky speciálně navržené pro pěstování rostlin, mají zvýrazněnou červenou a modrou část spektra, odstín světla je 077) (NARVA – zářivkové trubice, 2011). Teplota v kultivační místnosti byla nastavena na 21 °C (TAKAGI and QU, 1995) a fotoperioda 16 hod. světlo, 8 hod. tma (KAHANE *et al.*, 1997).

Už během průběžného hodnocení bylo zřejmé, že každý z obou genotypů reaguje na konkrétní složení media jinak. Při druhé fázi pokusu byla vytvořena fotodokumentace a průběžné hodnocení experimentu. U vytvořených cibulek byla otestována jejich životaschopnost při převodu do nesterilních podmínek. Část cibulek byla vždy do podmínek *in vivo* převedena bezprostředně po odebrání ze zkumavek, druhá část byla před výsadbou na 30 – 60 dní umístěna do chladničky s teplotou 6 °C. Následně bylo hodnoceno množství cibulek, které byly schopny v nesterilních podmínkách zakořenit a růst.

V laboratoři na pracovišti Ing. Jana Kozáka byla založena také *in vitro* kultura ze segmentů stroužků stejným způsobem, jako v první fázi experimentu (viz výše) za účelem otestování rostlin na přítomnost virů formou ELISA testů. Cílem bylo ověření, zda je při tomto způsobu založení kultury možné výběrem získat bezvirózní materiál. Testování 30 vzorků bylo provedeno ve Výzkumném ústavu bramborářským Havlíčkův Brod, s.r.o. Zjišťovala se pouze přítomnost viru OYDV, od kterého musí být nově registrované odrůdy podle evropské legislativy ozdraveny. Nicméně všechny testované vzorky tento vir obsahovaly. Vzhledem k finanční náročnosti ELISA testů a také předchozí publikaci výsledků jinými autory (HAVRÁNEK, 1972, KŘÍŽAN *et al.*, 2010) nebyly rostliny z kultur zakládaných prostřednictvím apikálního meristému na přítomnost virů testovány.

#### **4.2.6 Stanovení etylenu a CO<sub>2</sub>**

Etylen byl stanovován na plynovém chromatografu firmy FISSONS INSTRUMENT s kapilární 24 m dlouhou kolonou HP-PLOT/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ke stanovení byl tuberkulinovou stříkačkou odebrán vždy 1 ml ovzduší z kultivační nádoby uzavřené víčkem se septem uzpůsobeným k těmto odběrům. Detektor měl teplotu 200 °C, nástřik pak 230 °C a kolona 40 °C (FIŠEROVÁ, HRADILÍK, 1994, FIŠEROVÁ *et al.*, 2001, FIŠEROVÁ *et al.*, 2008).

Stanovení obsahu CO<sub>2</sub> v atmosféře kultivační nádoby bylo prováděno pomocí plynového chromatografu CHROM 5 s katharometrem s 1,5 m dlouhou náplňovou kolonou plněnou PROPAKem Q (PROKEŠ *et al.*, 2006). Získané výsledky 7 opakování byly přepočteny na standard plynů, zprůměrovány a zpracovány graficky s vypočtenou střední chybou.

#### **4.2.7 Ověření stability DNA *in vitro* množených rostlin**

U *in vitro* kultivovaných rostlin byla testována stabilita DNA, aby bylo ověřeno, zda při využití tohoto způsobu zakládání a kultivace rostlin nedochází ke změnám genotypu, což by mělo negativní vliv při ozdravování a množení česneku v podmínkách *in vitro* za účelem produkce bezvirózní sadby.

##### **4.2.7.1 Izolace rostlinné DNA**

Rostlinná DNA byla izolována z listů donorových rostlin pěstovaných v polních podmínkách a porovnána s DNA izolovanou z pletiv rostlin kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Postup při samotné izolaci DNA byl následující:

1. Pro každý vzorek bylo na analytických vahách odváženo přibližně 100 g listů rozděleného na menší segmenty, které následně byly přeneseny do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.
2. Rostlinný materiál byl zmrazen krátkým ponořením mikrozkušavek do tekutého dusíku a poté byl pomocí speciální plastové tyčinky homogenizován.
3. Mikropipetou bylo do mikrozkušavky s dokonale homogenizovaným materiálem přidáno 400 µl pufru AP 1 a 4 µl RNázy.
4. Mikrozkušavky byly uzavřeny a pomocí vertexu byl jejich obsah důkladně promíchán. Poté byly mikrozkušavky na dobu 10 minut umístěny do vodní lázně s teplotou vody 65 °C, přičemž během této doby byl 2 – 3krát obsah zkumavek protřepán.
5. Následně byly mikrozkušavky z vodní lázně vyjmuty a k jejímu obsahu bylo mikropipetou přidáno 130 µl pufru AP2. Pomocí vertexu MS1



byl opět obsah mikrozkuvek promíchán a po dobu 5 minut byly mikrozkuvky umístěny mezi kostky ledu.

6. Mezitím byly připraveny speciální fialové mikrozkuvky o objemu 2 ml, jež jsou součástí kitu. Do nich byl následně pomocí mikropipety nastavené na 500  $\mu$ l přenesen z původních mikrozkuvek celý obsah vzorku. Nové mikrozkuvky byly poté odstředovány na chlazené centrifuze při 18000 otáčkách/minutu po dobu 2 minut.
7. Na dně zkuvky byl centrifugací vytvořen tzv. pelet (pevná fáze). Tím byla pevná fáze oddělena od tekuté fáze obsahující DNA, která byla následně pomocí mikropipety nastavené na 400  $\mu$ l nasáta a přenesena do nové mikrozkuvky o objemu 1,5 ml, do které bylo navíc přidáno 600  $\mu$ l pufru AP3/E.
8. Z takto připravené směsi bylo odebráno 650  $\mu$ l a přeneseno na kolonku speciální bílé centrifugační mikrozkuvky o objemu 2 ml, která je součástí kitu. Vzorek byl přes kolonu v této mikrozkuvce centrifugován po dobu 1 minuty při 6000 otáčkách za minutu.
9. Tekutý podíl pod kolonou byl po centrifugaci odstraněn a na kolonku byl nanesen zbytek připravené směsi z předchozí mikrozkuvky a opět centrifugován při stejných otáčkách po dobu 1 minuty.
10. Tekutý podíl pod kolonou byl opět odstraněn a kolonka byla přenesena do nové mikrozkuvky o objemu 2 ml.
11. Následně bylo do kolony nepipetováno 500  $\mu$ l pufru AW a byla provedena centrifugace při 6000 ot./min. po dobu 1 minuty.
12. Tekutý podíl pod kolonkou byl odstraněn a na kolonku bylo opět nepipetováno 500  $\mu$ l pufru AW, tentokrát však byla prováděna centrifugace 2 minuty při 18000 ot./min.
13. Po odstranění tekutého podílu byla kolonka přemístěna do nové mikrozkuvky o objemu 1,5 ml. Následně bylo pomocí mikropipety na kolonku aplikováno 100  $\mu$ l přehřátého pufru AE a mikrozkuvka byla po dobu 5 minut ponechána stát při laboratorní teplotě.

14. Po uplynutí této doby byla provedena centrifugace při 6000 ot./min. po dobu 1 minuty.
15. Tekutý podíl byl ve zkumavce ponechán a na kolonku bylo opět nepipetováno 50  $\mu$ l přehřátého pufru AE a mikrozkuavka byla při laboratorní teplotě ponechána 5 minut odpočívat.
16. Byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 6000 ot./min. a byla kolonka odstraněna a mikrozkuavka s tekutým podílem obsahující rozpuštěnou DNA byla uzavřena a uskladněna v chladničce při 4 °C.

U získaných vzorků byla ověřena kvalita a množství přítomné izolované DNA. Byl použit UV-spektrofotometr Picondrop. Při této metodě absorbují nukleové kyseliny UV záření. Získané hodnoty absorpce byly pomocí empirických vztahů převedeny na potřebnou koncentraci nukleových kyselin. U vzorků kontaminovaných proteiny byl vypočítaný poměr absorpcí nižší než u vzorků nekontaminovaných. Pro kontrolu byl použit slepý vzorek pufru AE. Analýza přítomnosti DNA byla provedena při vlnové délce 260 nm a 280 nm, která potvrdila přítomnost DNA ve všech testovaných vzorcích.

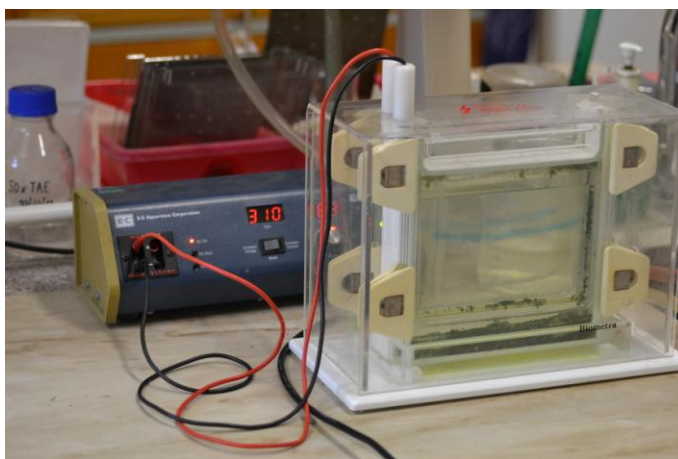
#### 4.2.7.2 PCR

Do mikrozkuavky o objemu 1,5 ml byla připravena reakční směs obsahující 16,8  $\mu$ l deionizované vody, 5  $\mu$ l pufru, 0,1  $\mu$ l dNTP (dinukleotid trifosfát), 1  $\mu$ l forward primeru, 1  $\mu$ l reverse primeru a 0,1  $\mu$ l *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymerázy. Takto připravená směs byla následně rozdělena po 24  $\mu$ l do PCR mikrozkuavek o objemu 0,2 ml. K tomu byl do každé zkumavky navíc přidán 1  $\mu$ l vzorku izolované DNA určeného k analýze. Mikrozkuavky se vzorky byly důkladně protřepány a následně umístěny do termocykleru Biometra T3, kde byl nastaven program pro iniciační denuraci. Celý program trval 9 minut, přičemž 30 s byla teplota 94 °C, při které dochází k denuraci, následovalo při teplotách 52 °C, 54 °C a 55 °C nasedání primerů, při teplotě 72 °C po dobu 1 minuty probíhala elongace a prodlužování 7 minut. Tyto reakce se 25krát opakovaly. Po PCR reakci následovalo dělení fragmentů na polyakrylamidovém gelu.

#### 4.2.7.3 Příprava polyakrylamidového gelu a průběh elektroforézy

Pro kontrolu produktů izolované DNA pomocí elektroforézy byl vybrán polyakrylamidový gel. Do skleněné kádinky bylo odměřeno 34,65 ml destilované vody, do které bylo následně přidáno 5 ml 10krát koncentrované TBE (trisfáze=trishydroxymethyldiaminomethan, kys. boritá). Poté bylo přidáno 10 ml AKRYL/BIS (akrylamid/bisakrylamid), 334 ml TEMED (tetramethyldiamin) a nakonec 334 ml APS (amonium persulfát – persíran amonný), který spouští polymerační reakci. Takto připravená směs gelu byla aplikována na předem připravené elektroforetické desky a následně byla ponechána ztuhnout.

Do jednotlivých komůrek v gelu vytvořených speciálním hřebenem byly aplikovány analyzované vzorky. Vlastní elektroforéza probíhala ve dvou fázích, přičemž první fáze trvala 10 minut při napětí 100 V, druhá fáze pak 60 – 100 minut při napětí 300 V.



Obr. 10: Probíhající elektroforéza (foto: V. Kozák, 5. 6. 2013)

Po dokončení elektroforézy následovalo barvení výsledných produktů, k čemuž byly namíchány tři různé roztoky pro vizualizaci produktů. Prvním roztokem byl fixační roztok, který obsahoval 356,4 ml destilované vody, 41,6 ml etanolu a 2 ml kyseliny octové. Druhý roztok obsahoval 1000 ml destilované vody a 2 g dusičnanu stříbrného. Třetím roztokem byl roztok – vývojka, který byl složen ze 730 ml destilované vody, 22,2 g hydroxidu sodného (NaOH) a 10 ml 37% roztoku formaldehydu. Vzhledem k toxicitě použitého materiálu vizualizace probíhala v digestoři na třepačce a při manipulaci byly používány gumové rukavice. Gel byl opatrně vyjmut ze skleněné formy a přenesen pomocí skleněné destičky do nádoby s fixačním roztokem. V této nádobě se nechal roztok na gel působit po dobu jedné minuty, poté byl přenesen do nádoby s roztokem dusičnanu stříbrného, kde došlo k navázání stříbra. V tomto roztoku byl gel ponechán 3 minuty. Po této době byl gel několikrát omyt destilovanou vodou a následně přenesen do nádoby s posledním vytvořeným roztokem,

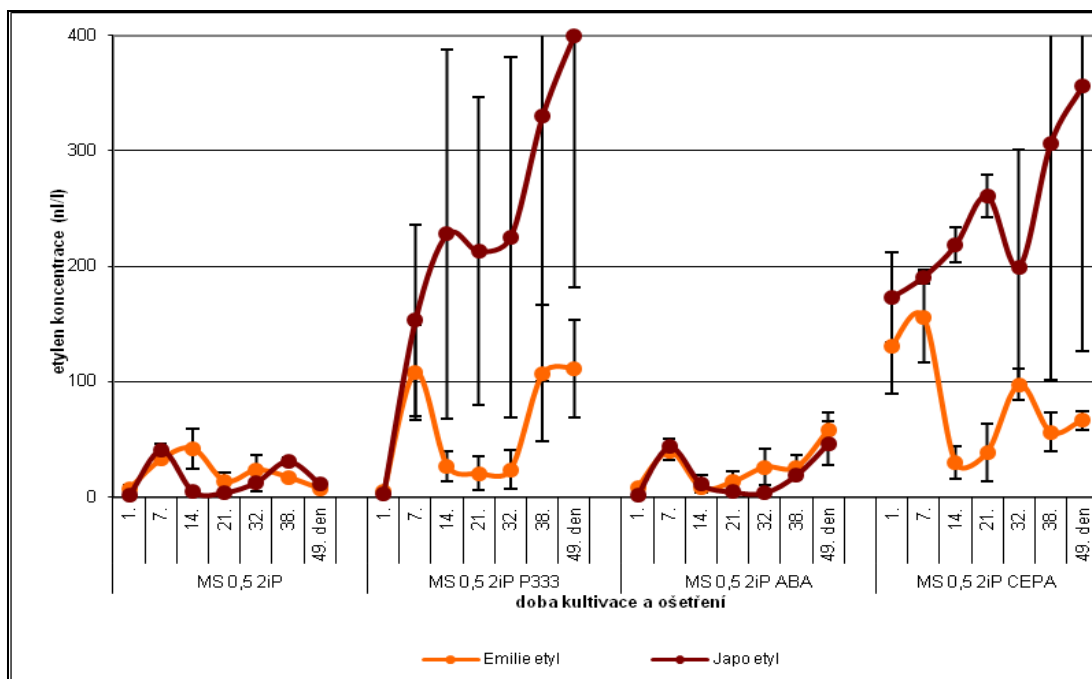
kde po 10 minutách došlo k vizualizaci produktů. Nakonec byl gel z nádoby vyňat a zataven do fólie, se kterou byl poté skenován.

Oskenovaný gel byl následně vyhodnocován. Pomocí statistického programu FreeTree (verze 9.1) byla zpracována binomická matice metodou UPGMA (Unweight Pair Group Method with Aritmetic Mean) a Jaccardovým koeficientem podobnosti. Pomocí programu TreeView (verze 6.1) byly výsledky převedeny do podoby dendrogramu, z kterého bylo možné zjistit totožnost či příbuznost testovaných genotypů (JACCARD *et al.*, 1908; HAMPL *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2009).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

V první fázi pokusu byly rostliny česneku 2 genotypů s označením Emilia a 'Japo' kultivovány na 4 variantách medií, kde byl sledován vliv růstových regulátorů na tvorbu etylenu a CO<sub>2</sub> a následná tvorba cibulek kultivovaných rostlin. Kontrolní varianta byla kultivována na MS mediu obsahujícím 0,5 mg/l 2iP a 0,2 mg/l NAA. Další varianty byly doplněné o 0,5 mg/l PP 333, 0,2 mg/l ABA a 1% CEPA (skleněná nádobka s CEPOU a s 3 naklíčenými obilkami ječmene, které uvolňovaly do prostředí kultivační nádobky vyšší koncentrace etylenu – viz graf. 1 a obr. 7). Explantátové kultury byly v této fázi pokusu zakládány ze segmentů vnitřní části stroužku.

Graf 1: Vliv růstových regulátorů na tvorbu etylenu kultivovanými rostlinami česneku



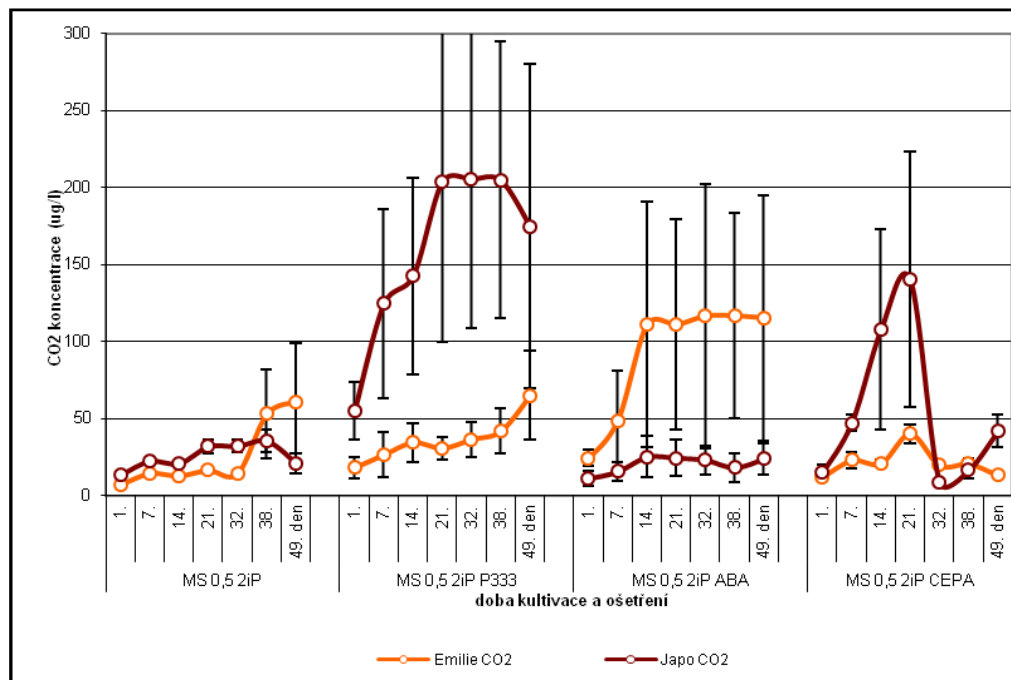
Z grafu 1 je zřejmé, že v kontrolní variantě nebyly v produkci etylenu mezi oběma genotypy statisticky významné rozdíly, s výjimkou 14. dne po založení kultury, kdy u genotypu 'Japo' produkce etylenu výrazně klesla, zatímco u Emilie stále ještě rostla a klesla o týden později. Z těchto výsledků by se dalo usuzovat na pomalejší růst Emilie, přičemž v polních podmínkách má naopak širokolistý nepaličák Emilie rychlejší růst a vývoj než úzkolistý nepaličák 'Japo'. Podobný průběh produkce etylenu kultivovaných rostlin byl i u varianty s přidavkem 0,2 mg/l ABA, přičemž rozdíl mezi genotypy v 14. dni po založení kultivace se neopakoval,

ovšem statisticky významný rozdíl byl zaznamenán 49. den po založení kultury, kdy u kontroly obsah etylenu v kultivační nádobce klesl na minimum, zatímco u varianty s ABA obsah etylenu u obou genotypů stoupl na maximum této varianty. Je tak zaznamenán inhibiční vliv ABA na růst rostlin česneku.

Statisticky průkazné rozdíly v produkci etylenu byly zaznamenány u variant s PP 333 a CEPA. U varianty s PP 333 u obou genotypů se výrazně zvýšil obsah etylenu v kultivační nádobce při měření 7 dní po založení kultury. U odrůdy 'Japo' byl po celou dobu kultivace obsah etylenu v kultivační nádobce statisticky průkazně vyšší než u kontroly a u varianty s ošetření kyselinou abscisovou. Naproti tomu u odrůdy Emilia po výrazném počátečním zvýšení produkce etylenu rostlinami následně obsah etylenu poklesl a 14. až 32. den po založení kultury se držel na úrovni shodné s kontrolou. Koncentrace etylenu u tohoto genotypu opětovně stoupla 38. den po založení kultury a na podobné úrovni se držela i při následujícím měření.

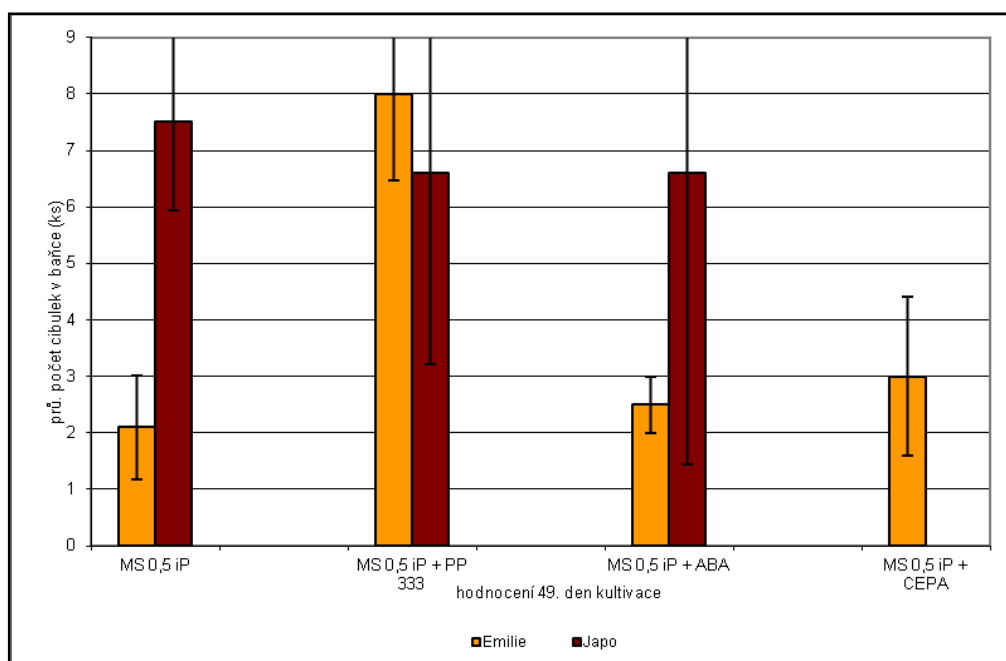
U explantátů genotypu Emilia ošetřených CEPA počáteční vysoká koncentrace etylenu do druhého měření mírně stoupla, následně však výrazně klesla a hodnoty naměřené 14 a 21 dní po založení kultury byly srovnatelné s kontrolou. Při následujících 3 měření byla zjištěna statisticky průkazně vyšší koncentrace etylenu proti kontrole. U genotypu 'Japo' obsah etylenu v kultivačních nádobách rostl během kultivace téměř konstantně, s výjimkou měření 32. den po založení kultury, kdy byl zaznamenán náhlý pokles. Je zřejmé, že po celou dobu kultivace na tomto mediu byla koncentrace etylenu v nádobkách statisticky průkazně výrazně vyšší než u kontroly.

Graf 2: Vliv růstových regulátorů na tvorbu CO<sub>2</sub> kultivovanými rostlinami



Produkce CO<sub>2</sub> kultivovanými rostlinami byla u obou genotypů v kontrolní variantě velmi podobná, zpočátku Emilie produkovala méně tohoto plynu než 'Japo', 38. i 49. den po založení kultury byla však zaznamenána vyšší produkce CO<sub>2</sub> u Emilie. Rozdíly mezi genotypy však nebyly zásadní, i když by se dalo usuzovat na pomalejší růst Emilie. Při ošetření explantátů PP 333 a CEPA odrůda Emilie nereagovala průkaznými změnami produkce CO<sub>2</sub>, zatímco při ošetření ABA produkce etylenu výrazně vzrostla a na vysoké hladině se tento plyn udržel po celou dobu kultivace. Obráceně reagoval genotyp 'Japo', který se při kultivaci na mediu s ABA produkcí etylenu příliš nelišil od kontroly, zatímco ošetření PP 333 výrazně zvýšilo koncentraci CO<sub>2</sub> v kultivačních nádobkách. Vysoká koncentrace tohoto plynu byla také zaznamenána v první polovině kultivace na mediu s CEPA, ke konci kultivace se však snížila na hladinu srovnatelnou s kontrolou.

Graf 3: Vliv růstových regulátorů na tvorbu cibulek



Z grafu 3 je zřejmé, že u odrůdy 'Japo' nebyly při kultivaci explantátů založených ze segmentů vnitřní části stroužku zaznamenány výrazné rozdíly mezi působením jednotlivých variant medií na multiplikaci cibulek, ale paclobutrazol statisticky průkazně zvyšoval produkci etylenu a CO<sub>2</sub>. Při kultivaci na mediu s CEPA došlo u odrůdy 'Japo' k vysokému procentu úhynu explantátů. Multiplikaci cibulek u genotypu Emilia statisticky průkazně zvýšila přítomnost PP 333 v mediu, a produkce obou plynů zvýšena nebyla. Ošetření ostatními růstovými regulátory nejevilo významné odchylky od kontroly. Ze získaných výsledků lze vyvodit, že každý genotyp má své vlastní hladiny endogenních hormonů a jejich interakce s exogenními hormony proto není stejná. Podobně působí i vyšší koncentrace etylenu a CO<sub>2</sub>, které inhibují tvorbu cibulí u Japo, ale v optimální koncentraci je etylen schopen zvýšit tvorbu cibulí u Emilie.





Obr. 11: Emilie na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 12: Emilie na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 13: Emilie na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 14: Emilie na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 15: Emilie na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 16: Emilie na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 17: Emilie na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 18: Emilie na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 19: 'Japo' na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 20: 'Japo' na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 21: 'Japo' na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 22: 'Japo' na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)





Obr. 23: 'Japo' na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 24: 'Japo' na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 25: 'Japo' na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 26: 'Japo' na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



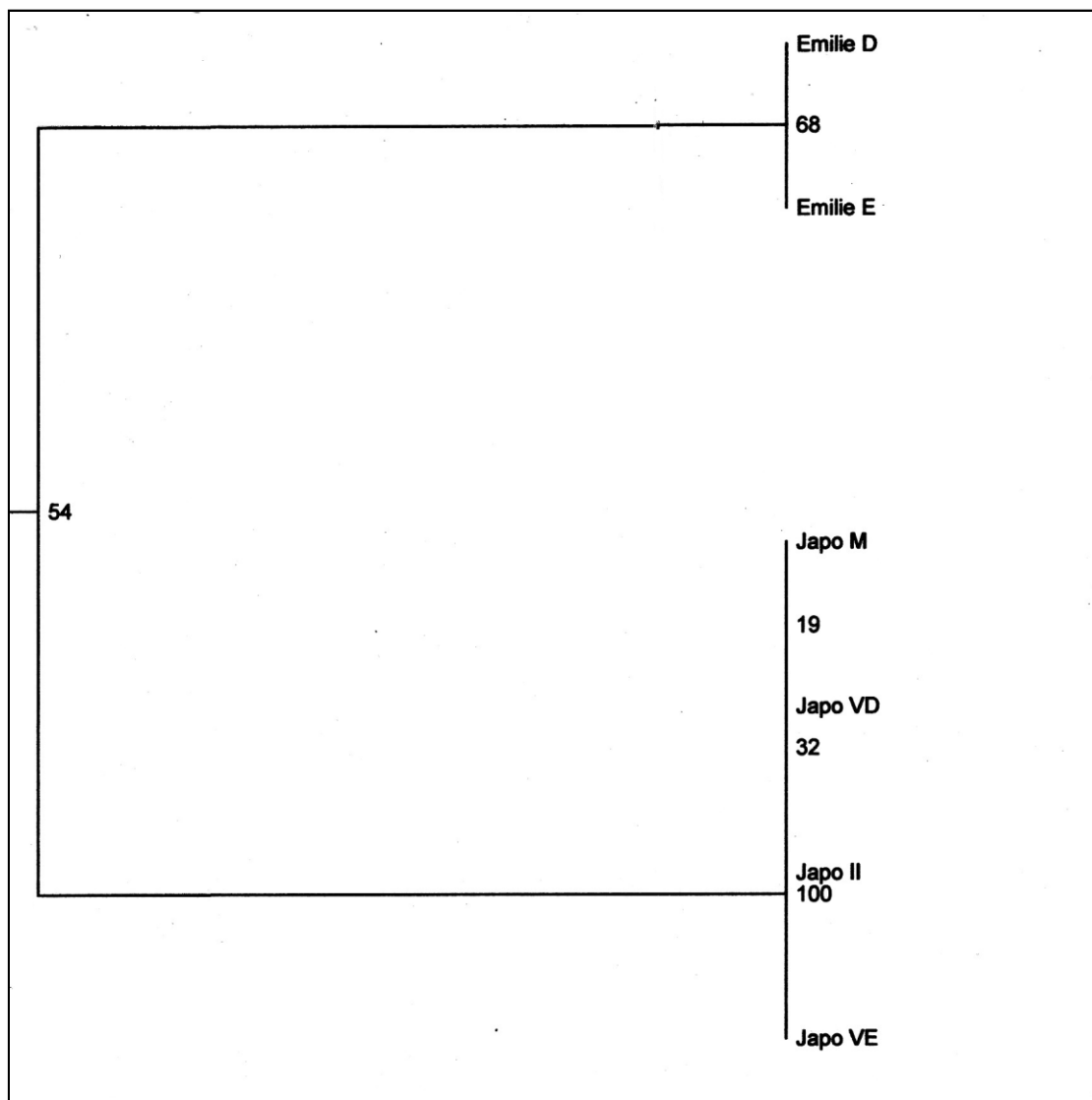
Obr. 27: 'Japo' na MS mediu s 80 g/l sacharózy 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)



Obr. 28: 'Japo' na MS mediu s 80 g/l sacharózy 5 měsíců po založení kultury (foto: V. Kozák, 5. 3. 2013)

Od obou odrůd bylo kultivováno 15 explantátů za účelem testování přítomnosti OYDV. Přítomnost viru byla stanovena pomocí ELISA testů v laboratoři Výzkumného ústavu bramborářském Havlíčkův Brod, s.r.o. Nicméně u všech testovaných vzorků byla přítomnost viru OYDV potvrzena. Nepotvrdila se tedy teze, že by mohlo být možné výběrem a exogenní aplikací ribavirinu na celé stroužky získat v kultuře *in vitro* nějaké procento bezvirózních rostlin. Tuto metodu zakládání kultur tedy není možné využít pro ozdravování česneku, využití může však nalézt ve šlechtitelství či při udržování klasických starších neozdravených odrůd. Vzhledem k finanční náročnosti ELISA testů nebyla přítomnost viru OYDV stanovována u explantátů založených z apikálního meristému. Výsledky úspěšnosti ozdravení rostlin kultur založených z apikálního meristému publikoval např. Ing. Pavel HAVRÁNEK, CSc. (1972), kdy se mu podařilo ozdravit 25 – 42 % rostlin. Lepších výsledků dosáhl KŘÍŽAN *et al.* (2010), kteří v metodice ozdravování česneku od virů uvádí 47% – 89% úspěšnost ozdravení při kombinaci chemoterapie s izolací apikálního meristému.

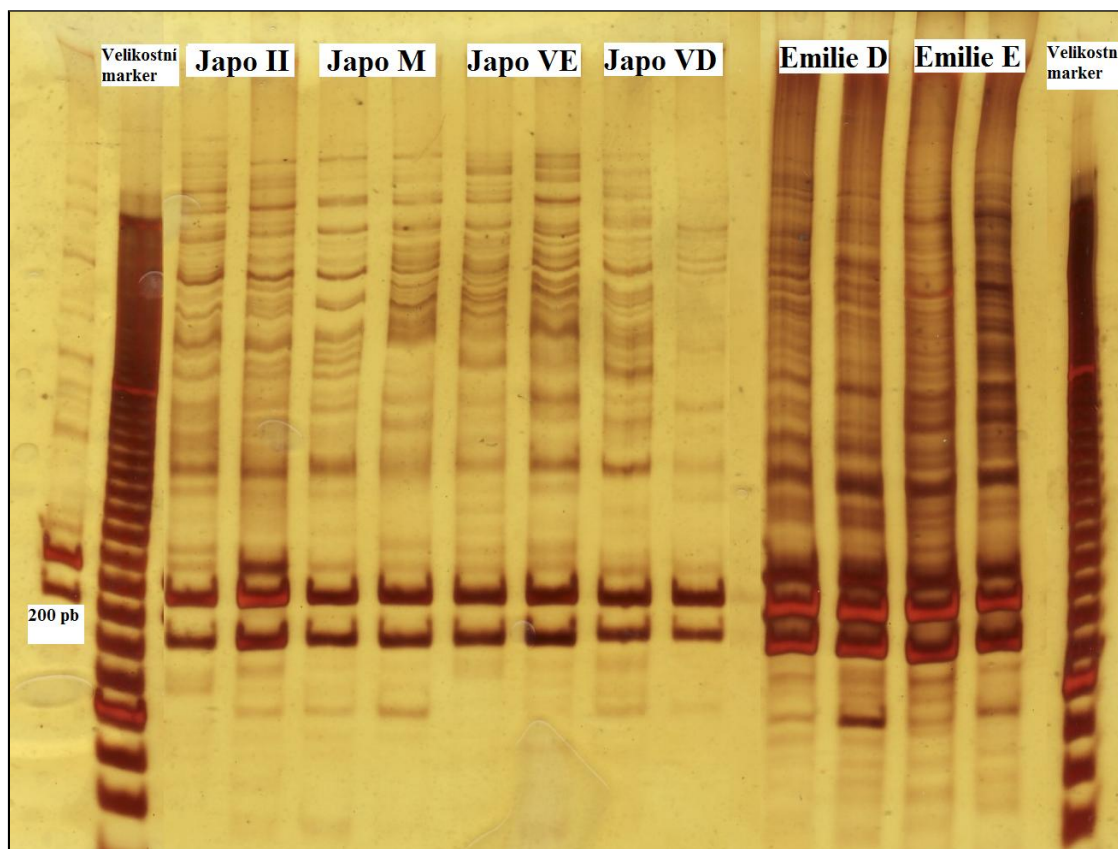
Během kultivace česneku v podmínkách *in vitro* byla ověřena genetická stabilita explantátů porovnaná s DNA rostlin z polního pěstování. U genotypu 'Japo' byla DNA porovnána také s ozdraveným klonem této odrůdy registrovaným pod názvem 'Japo II' a dalším málo výnosným klonem původní staré odrůdy 'Japo'.



Obr. 29: Dendrogram analyzovaných genotypů a klonů česneku Emilia a 'Japo' (Japo II = registrovaná odrůda 'Japo II' z polního pěstování, Japo M = původní 'Japo' malé z polního pěstování, Japo VE = velké původní 'Japo' z *in vitro*, Japo VD = velké původní 'Japo' z polního pěstování, Emilie D = Emilie z polního pěstování, Emilie E = Emilie z *in vitro*)

Pomocí DNA markerů bylo potvrzeno, že při kultivaci rostlin česneku založených kultur ze segmentů vnitřní části stroužku v podmínkách *in vitro*, nedochází u explantátů k žádné změně struktury DNA v porovnání s rostlinami pěstovanými v polních podmínkách. Ke stejnému závěru došla také ve své práci STAŇKOVÁ (2014), která stabilitu DNA u *in vitro* kultivovaného česneku ověřovala u odrůd 'Lukan' a novošlechtění LAN (v současné době již zaregistrována pod názvem 'Havel'). Genetická stabilita explantátů je jedna z nejdůležitějších faktorů pro množení česneku v *in vitro* podmínkách za účelem získání kvalitního sadbového materiálu. Zároveň byla ověřena genetická shodnost málo výnosného klonu odrůdy 'Japo' (Japo M) s několikanásobně výnosnějším klonem této odrůdy (Japo VD). Vzhledem k tomu,

že nová odrůda 'Japo II' vznikla ozdravením jednoho z málo výnosných klonů původní odrůdy 'Japo', nabízí se možnost pokusit se v udržovacím šlechtění odrůdy 'Japo II' ozdravit klon velkého původního 'Japa' a jeho následné porovnání s odrůdou 'Japo II'. V případě, že by tento klon projevil lepší kvalitativní či výnosové vlastnosti, bylo by možné nahradit tímto klonem v současné době využívaného materiálu 'Japo II'.

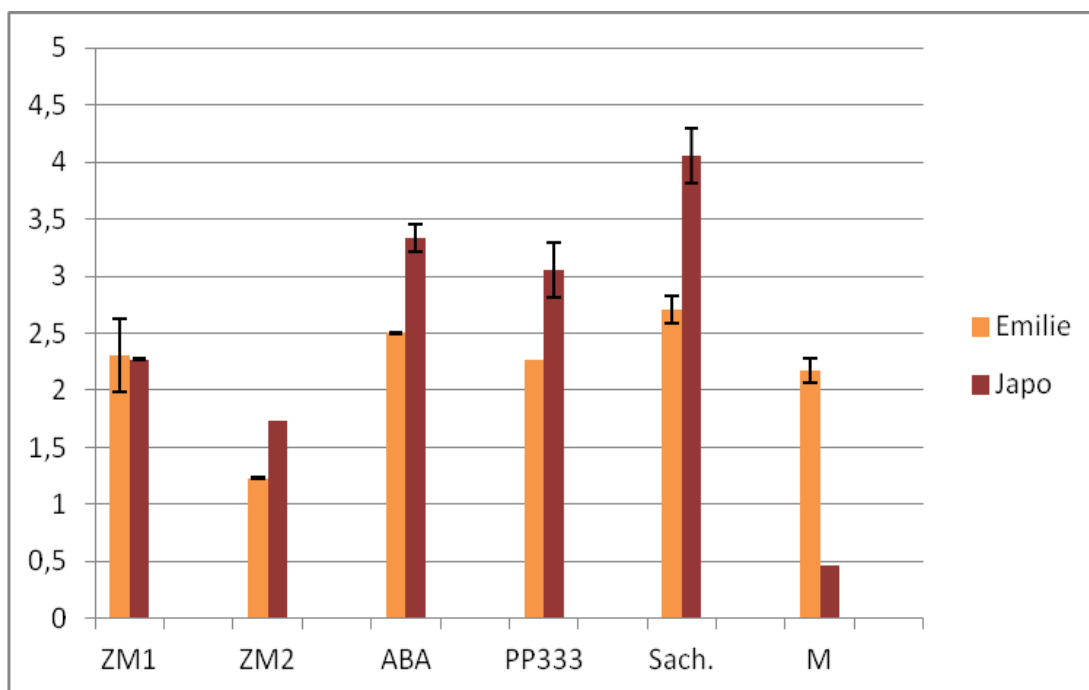


Obr. 30: Polyakrylamidový gel (Japo II = registrovaná odrůda 'Japo II' z polního pěstování, Japo M = původní 'Japo' malé z polního pěstování, Japo VE = velké původní 'Japo' z *in vitro*, Japo VD = velké původní 'Japo' z polního pěstování, Emilie D = Emilie z polního pěstování, Emilie E = Emilie z *in vitro*)

V druhé fázi pokusu byl sledován vliv růstových regulátorů na tvorbu cibulek explantátů založených z apikálního meristému. Změna způsobu založení kultury byla provedena z toho důvodu, že u zakládání kultur ze segmentů vnitřní části stroužku mohla výsledky ovlivnit velikost segmentu či přítomnost apikálního meristému pouze v jednom ze 2 – 4 segmentů získaných z jednoho stroužku česneku. Vzhledem k tomu, že u předchozího pokusu velmi často po delší kultivaci docházelo k úhynu rostlin a bylo získáno jen velmi malé množství cibulek vhodných k převedení do podmínek *in vivo*, bylo pro tento experiment změněno i složení základního media (kontroly). Kontrola č.1 obsahovala MS medium s 30 g/l sacharózy, 7 g/l agaru, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP a 0,5 mg/l GA3. Další varianty media byly stejného

složení s přidavkem 0,2 mg/l ABA, 0,5 mg/l PP 333 nebo 50 g/l sacharózy (celkem tedy tato varianta obsahovala 80 g/l sacharózy). Byla sledována i kontrola č. 2, která byla stejného složení jako kontrola v předchozí fázi pokusu.

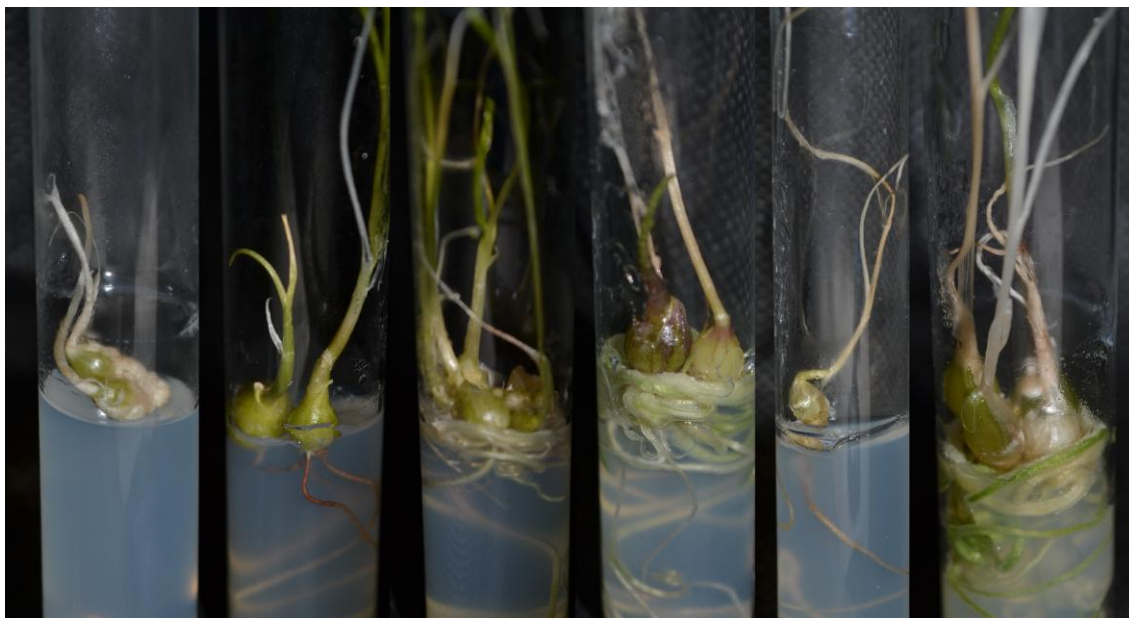
Graf 4: Vliv růstových regulátorů na multiplikaci cibulek



ZM1 – kontrola 1, ZM2 – kontrola 2 (viz tab. 2)

Zatímco u kontroly č. 1 nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi oběma genotypy, u kontroly č. 2 bylo vytvořeno více cibulek u odrůdy 'Japo'. Poměrně málo výrazně na jednotlivé varianty medií reagoval genotyp Emilia, u kterého nebyly zaznamenány statistické odchylky od kontroly č. 1. Explantáty Emilie na kontrolním mediu č. 2 produkovaly cibulek méně. Stejně tak na toto medium reagovalo sníženým počtem vytvořených cibulek 'Japo'. Odrůda 'Japo' na ostatní media reagovala vyšším počtem multiplikovaných cibulek, nejvýznamnější zvýšení cibulek bylo zaznamenáno na mediu s vyšší koncentrací sacharózy.



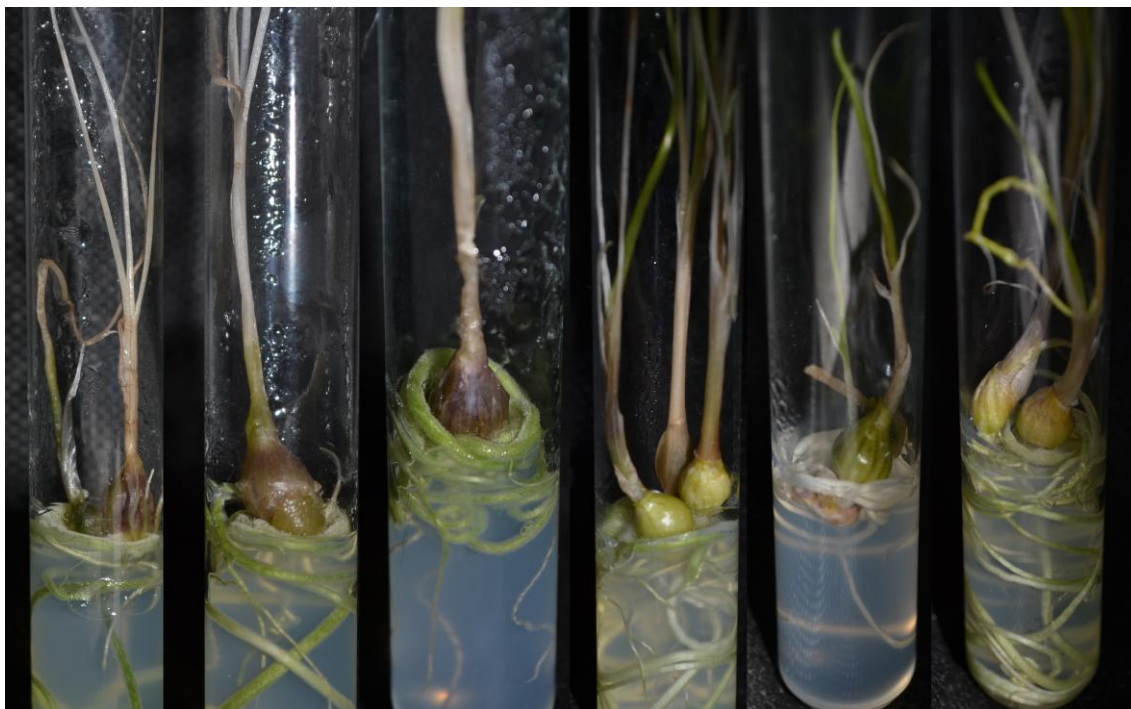


**Obr. 31:** Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM1 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

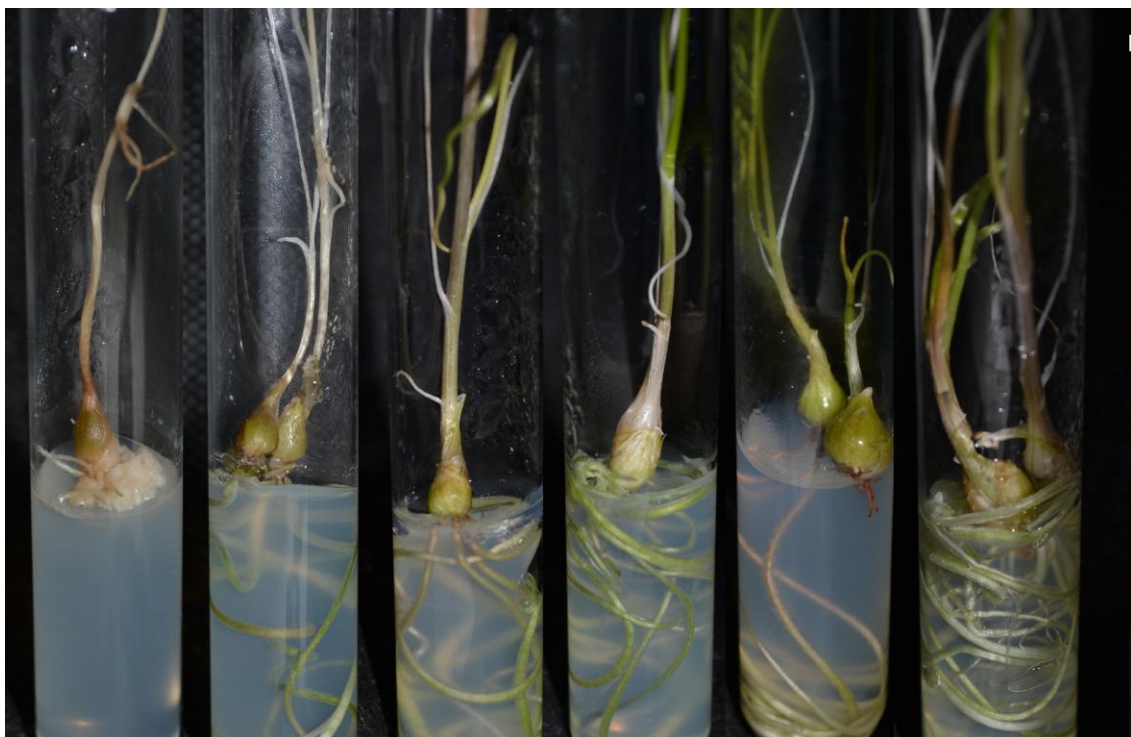


**Obr. 32:** Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM2 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

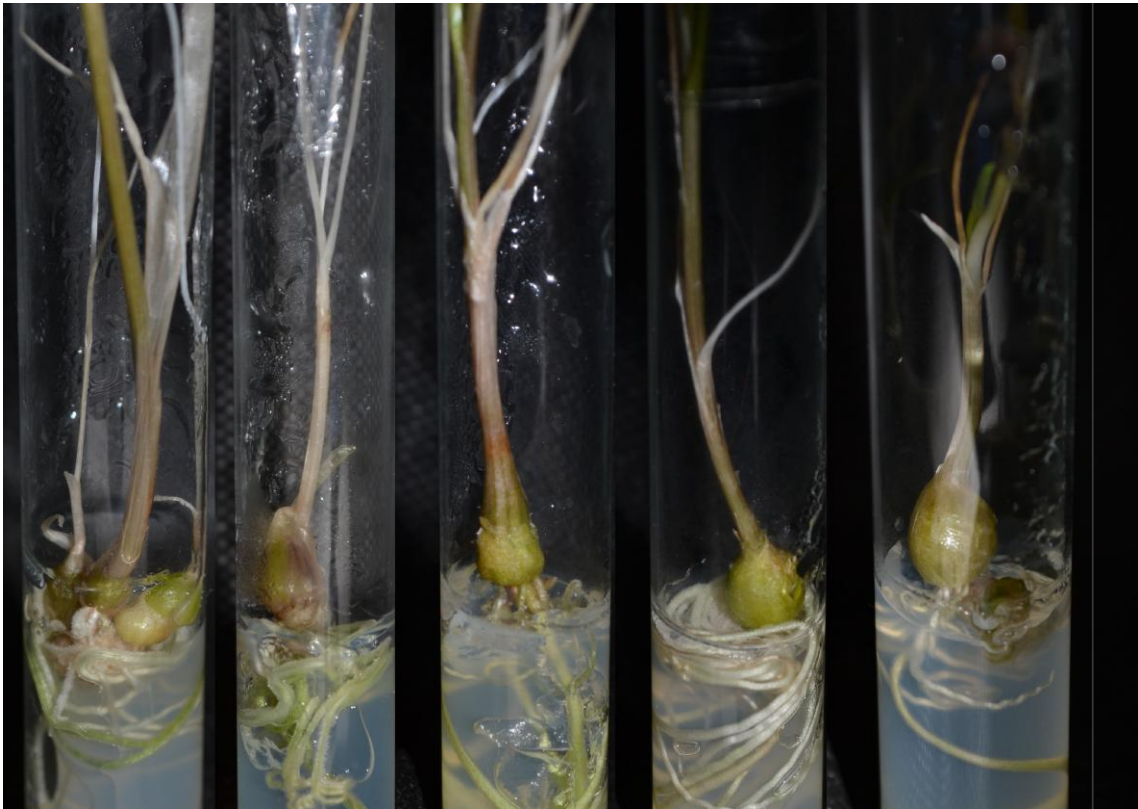




Obr. 33: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s 80 g/l sacharózy (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)



Obr. 34: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s PP 333 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

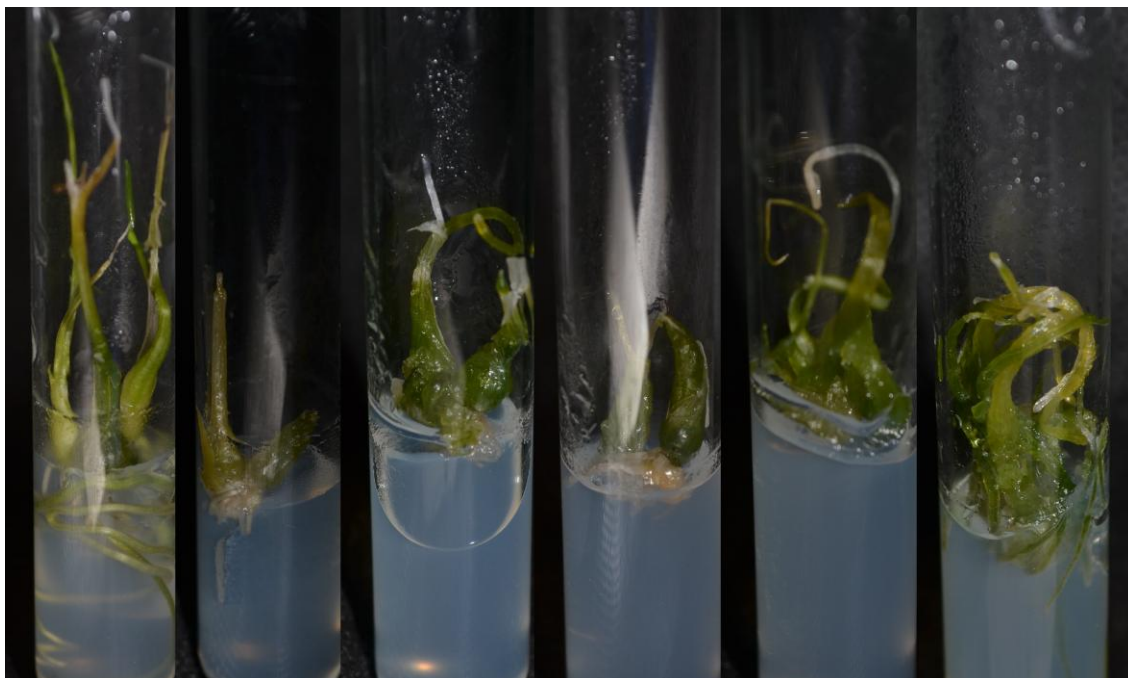


Obr. 15: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu ABA (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

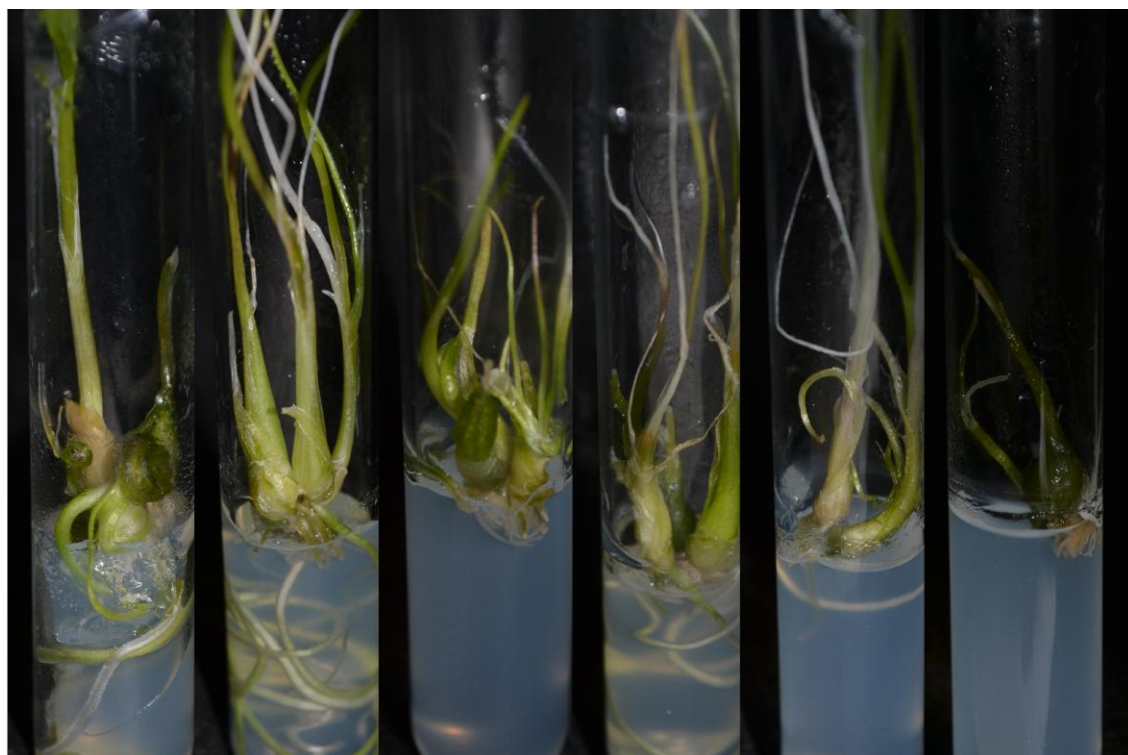


Obr. 35: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM1 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

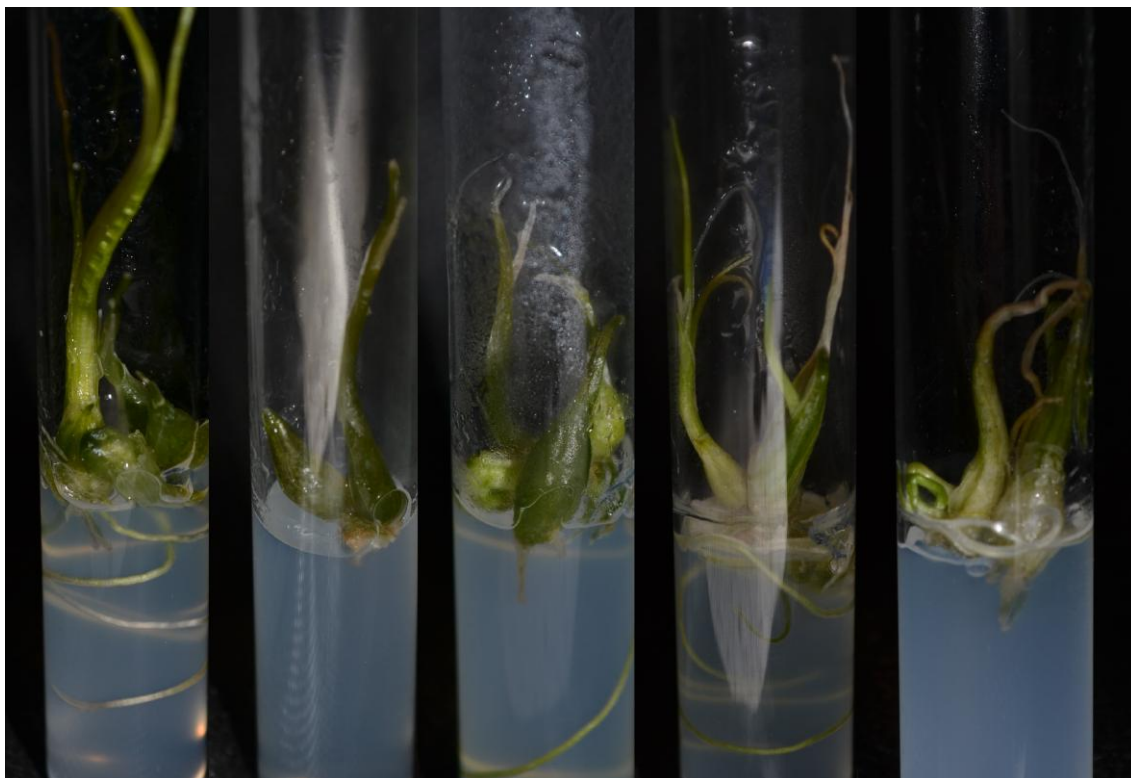




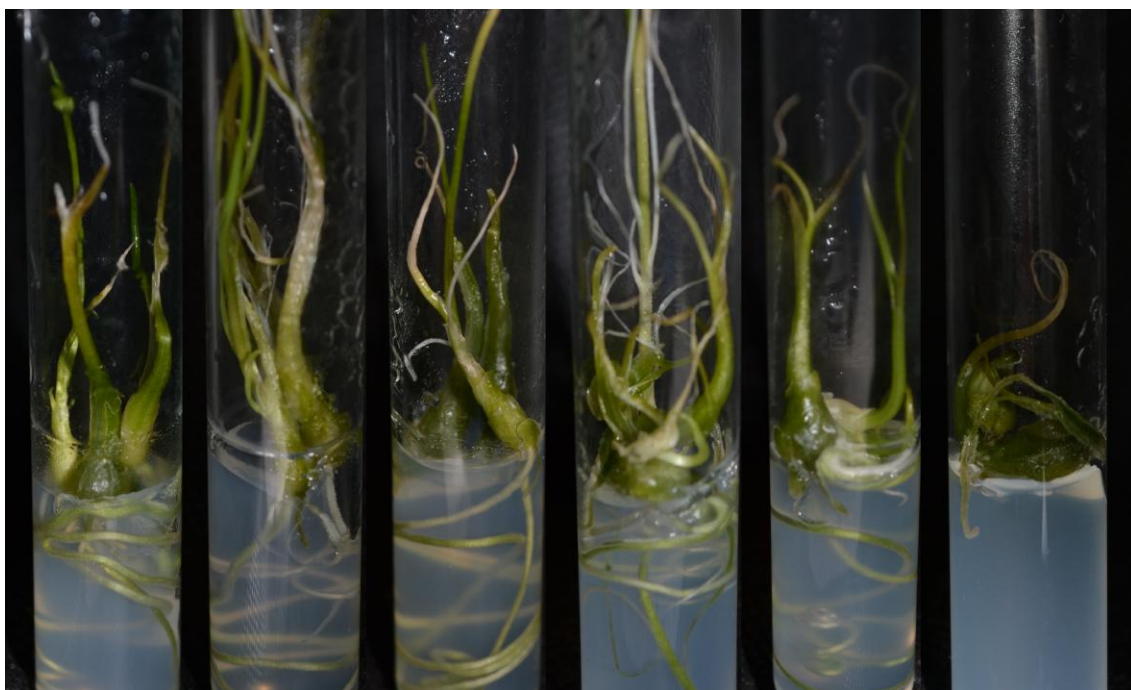
Obr. 36: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM2 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)



Obr. 37: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s 80 g/l sacharózy (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)



Obr. 38: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s PP 333 (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)



Obr. 39: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s ABA (foto: V. Kozák, 21. 1. 2015)

Nepovedlo se tedy potvrdit předchozí experiment, kde genotyp s označením Emilie produkoval cibulky nejvíce na mediu s PP 333. Rozdílnost výsledků lze přičíst odlišným podmínkám využívaných laboratoří či způsobu založení kultury (zkumavky

překryty potravinářskou folií mohou vytvářet jiné plynné složení v kultivační nádobě, než je tomu u kultivačních nádob uzavřených kovovým uzávěrem se septem). Dále mohl výsledky ovlivnit např. typ osvětlení. Zatímco v prvním experimentu byly česneky kultivovány pod klasickými zářivkami, v druhém experimentu byly použity speciální zářivkové trubice pro pěstování rostlin. TAKAGI and QU (1995) hodnotili vliv různých zdrojů světla na tvorbu cibulek u česneku. Zjistili, že nejvíce stimuluje tvorbu cibulek zdroj světla obsahující infračervenou složku světla. Naopak jimi testované speciální PG lampy pro pěstování rostlin stimulovaly tvorbu a nárůst cibulek nejméně.

Kultury založené z apikálního meristému obecně tvořily výrazně méně cibulek než explantáty ze segmentů vnitřní části stroužku. Explantáty založené za apikálního meristému tvořily u genotypu Emilia průměrně v závislosti na typu obsahu media 1,2 až 2,7 cibulek a u odrůdy 'Japo' 1,7 – 4,1 cibulek. Explantáty založené ze segmentů vnitřních částí stroužků tvořily u Emilie průměrně 2,1 – 8 cibulek, u 'Japa' 6,6 – 7,5 cibulek. KŘIŽAN *et al.* (2010) uvádí u explantátů založených z apikálního meristému multiplikační koeficient 3,75. Jednotlivé genotypy však vykazují výrazné odchylky v multiplikačním koeficientu (HAQUE *et al.*, 2000, STAŇKOVÁ, 2014). Nicméně pozitivní vliv PP 333 na tvorbu cibulek uvádí i STAŇKOVÁ (2014) u odrůd 'Lukan', 'Slavin' a 'Havran'.

U odrůdy Emilie bylo velmi zajímavých výsledků dosaženo u varianty, která byla po dobu 6 měsíců kultivována na kontrolním mediu č. 1 v malých zkumavkách o rozměrech 7,5 x 0,9 cm s 1,5 ml media. Do zkumavek byl umístěn meristém a během celé 6 měsíční kultivaci nebyly ani jednou explantáty přepasážovány na nové medium, zatímco u kontroly byly explantáty přepasážovány na nové medium do větších zkumavek jednou za 2 měsíce. V počtu vytvořených cibulek nebyly zaznamenány statistické rozdíly mezi touto variantou a kontrolou.



Obr. 40: Emilie v malé zkumavce pro založení kultury (vpravo – stáří explantátu 4 měsíce) a ve zkumavce pro následnou kultivaci (vlevo - stáří explantátů 1 rok) (foto: V. Kozák, 11. 4. 2015)

Rozdíl nebyl ani ve velikosti cibulek vytvořených v malých zkumavkách bez pasážování a ve velkých zkumavkách s jednou za 2 měsíce pastovanými rostlinami. Cibulky byly navíc zataženy a v ideální formě pro převod do nesterilních podmínek. Tento fakt přináší poměrně významnou ekonomickou výhodu kultivace tohoto genotypu, neboť ušetří pracovní nároky i finance na použitá media. Explantáty odrůdy 'Japo' za stejných podmínek ve většině případů (81 %) uhynuly.

Zatímco Emilie na všech variantách medií dokázala vytvořit životaschopné zatažené cibulky vhodné pro převedení do podmínek *in vivo*, odrůda 'Japo' reagovala na různá media pouze odlišným množstvím multiplikovaných cibulek a jejich velikostí, ovšem cibulky obvykle nezatahovaly ani po roční kultivaci v *in vitro* podmínkách a zatažené cibulky se vyskytovaly pouze ojediněle. Zatažení cibulek u Emilie podporovala delší perioda mezi pasážováním na nová media, kdežto 'Japo' za stejných podmínek obvykle zvyšovalo výskyt hyperhydratace pletiv nebo úplný úhyn explantátů.

Vzhledem k tomu, že se málo publikací věnuje převodu *in vitro* množených česneků do nesterilních podmínek, byly provedeny 4 experimenty s převodem cibulek Emilie do *in vivo* podmínek. V prvním případě byly cibulky ihned převedeny do autoklávování sterilizovaného substrátu a zavlaženy roztokem vody s Previcurem o koncentraci 5 ml/l. Následně byly zavlažovány vodou s 0,5 mg/l GA3 pro odbourání případné dormance. Podle našich zkušeností tento roztok pozitivně působil na rašení a kořenění slabě dormantních stroužků česneku (testováno na genotypech Emilie, 'Bjetin' a 'Japo') před převodem do podmínek *in vitro*. Nicméně na cibulkách získaných z *in vitro* množení toto ošetření způsobilo inhibici zakořeňování. Z cibulek vyrostly pouze 3 – 4 listy ze zásobních látek v cibulce, a poté rostliny uhynuly. Jiné cibulky byly pouze ošetřeny Previcurem a pěstovány pod umělým osvětlením zářivek pro pěstování rostlin Narva BIO vital. I u této varianty převodu docházelo k problémům se zakořeňováním a rostliny postupně uhynuly. V dalších dvou variantách byly cibulky převedeny do sadbovačů s rašelinovým substrátem a pískem v poměru 2:1 a zavlaženy roztokem vody s Previcurem 5 ml/l. U obou variant bylo použito 50 cibulek. Cibulky pro první variantu byly po vyjmutí ze zkumavek umístěny na 60 dní do chladničky do uzavřených skleniček při teplotě 5 °C ve tmě. Poté byly vysazeny do sadbovačů a umístěny do skleníku. Ve druhé variantě byly cibulky ihned po odebrání ze zkumavek vysazeny do stejných podmínek.



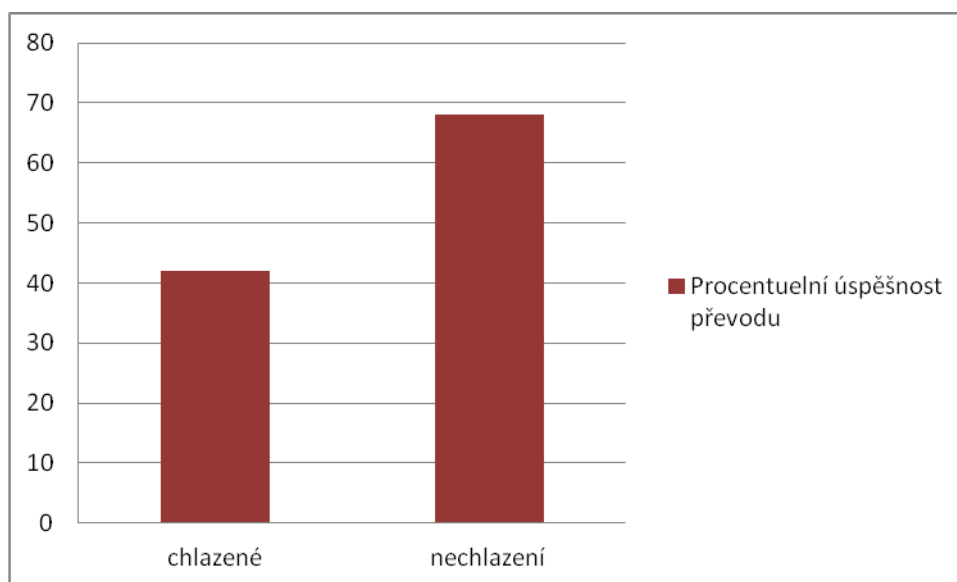


Obr. 41: Cibulky Emilie 14 dní po převodu do nesterilních podmínek a pěstování pod umělým osvětlením (foto: V. Kozák, 25. 11. 2014)



Obr. 42: Cibulky převedené z in vitro podmínek do substrátu - 65 dní po převodu (foto: V. Kozák, 3. 5. 2015)

Graf 5: Vliv chladového skladování cibulek Emilie před převodem do *in vivo* podmínek



Po ukončení chlazení bylo již 9 menších cibulek (což odpovídá 18 %) znehodnoceno (cibulky seschly). Dalších 20 cibulek nevyrašilo. Vyrašilo pouze 21 cibulek (42 %) (graf 5), které byly po 30 dnech pěstování v sadbovačích přesazeny do rašelinového větších nádob s rašelinovým substrátem. Lepších výsledků bylo docíleno při bezprostřední výsadbě cibulek ihned po odebrání ze zkumavek, kdy vyrašilo 34 cibulek (68 %). I tyto cibulky byly následně ze sadbovačů přesazeny do větších nádob, ve kterých jsou úspěšně pěstovány až do současnosti. Obdobný postup, který se ukázal jako nejvhodnější, popisuje HAQUE *et al.* (2000). Popisuje téměř 100% úspěšnost převodu, nicméně k experimentu využívali asijské genotypy česneku a ve zkumavkách se jim u většiny genotypů dařilo dopěstovat větší cibulky.

V případě, kdy byly zkumavky se zataženými cibulkami na mediu pro odbourání případné dormance umístěny na 30 dní do chladničky s teplotou 5 °C a tmou, bylo podpořeno opětovné prorůstání cibulek s etiolizovanými listy. Toto ošetření je tedy před převodem cibulek do nesterilních podmínek nevhodné.



## 6 ZÁVĚR

U genotypu s označením Emilia byla mírně zvýšena produkce etylenu při kultivaci na mediu s přidáním PP 333 a CEPA. Statisticky průkazným zvýšením etylenu na tyto varianty medií reagovala odrůda jarního nepaličáku 'Japo'.

Produkce CO<sub>2</sub> se u Emilie statisticky průkazně zvýšila při použití media s ABA. Odrůda 'Japo' reagovala zvýšenou produkcí CO<sub>2</sub> na media s PP 333 a CEPA.

Explantáty založené ze segmentů vnitřní části stroužků u genotypu Emilie nejvíce produkovaly cibulky na mediu s přidáním růstovým regulátorem PP 333, u genotypu 'Japo' nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami medií, pouze u varianty CEPA se vyskytlo vysoké procento úhynu explantátů.

Při kultivaci rostlin Emilia založených z meristémů nemělo přidání růstových regulátorů do media statisticky průkazný vliv na tvorbu cibulek, na mediu bez GA3 byla tvorba cibulek nižší. Odrůda 'Japo' produkuje nejvíce cibulek na mediu se zvýšenou koncentrací sacharózy na 80 g/l. Produkci cibulek u této odrůdy zvyšuje také exogenní ABA či PP 333.

Genetická informace při *in vitro* množení česneku zůstává nezměněna.

Při založení kultur ze segmentů vnitřní části stroužku ošetřených ribavirinem nedochází k ozdravení rostlin od viru OYDV.

U genotypu Emilie je možné získat stejný počet cibulek i bez průběžného pasážování explantátů na nová media. Zároveň na všech variantách medií je schopna vytvořit zatažené cibulky vhodné pro převod do nesterilních podmínek.

Největší úspěšnost při převodu cibulek do podmínek *in vivo* lze dosáhnout při výsadbě cibulek do substrátu bezprostředně po vyjmutí ze zkumavek a následném dopěstování ve skleníku.

## 7 SOUHRN, RESUME A KLÍČOVÁ SLOVA

V bakalářské práci bylo sledováno, jak ovlivňuje multiplikaci cibulek přidání růstových regulátorů PP 333, CEPA, ABA do media nebo zvýšení koncentrace sacharózy v mediu při kultivaci česneku v podmínkách *in vitro*. Základní medium pro kultury ze segmentů se skládalo z MS media s 0,5 mg/l 2iP, 0,2 mg/l NAA, 7 g/l agaru a 30 g/l sacharózy a pro kultury z meristémů bylo k MS mediu přidáno 0,5 mg/l GA3 a iP bylo nahrazeno stejnou koncentrací BAP.

Experiment byl prováděn na 2 neregistrovaných genotypech česneku s pracovním názvem Emilia a 'Japo'. Sledována byla i produkce CO<sub>2</sub> a etylenu kultivovanými rostlinami a její zpětný vliv na multiplikaci cibulek. Explantáty založené ze segmentů vnitřní části stroužku po ošetření ribavirinem byly testovány na přítomnost viru OYDV a byla provedena DNA analýza za účelem ověření genetické stability *in vitro* kultivovaných rostlin.

V práci byly zjištěny statisticky významné rozdíly v produkci cibulek u jednotlivých genotypů na testovaných mediích.

**Klíčová slova:** paclobutrazol, kyselina abscisová, CEPA, CO<sub>2</sub>, etylen, sacharóza, ELISA test, DNA analýza

## **RESUME**

In this Bachelor's thesis we studied influencing of bulbs multiplications growing in vitro by adding grow-regulators PP 333, CEPA, ABA to the medium or increase of sucrose concentration in the medium. The culture from segments of inner clove part was cultivation on primary MS medium and 0.5mg/l GA3 was added and 2iP was replaced by the similar concentration of BAP for the cultures from apical meristems.

The experiment was made with 2 unregistered garlic genotype with working names Emilia and 'Japo'. We also observed CO<sub>2</sub> and ethylene production by the growing plants and influencing bulbs multiplications by these gases. Explantats made from segments of inner clove part after ribavirin application were tested if they contains OYDV virus and DNA analysis was made in order that we could verify genetic stability of in vitro growth plants.

In this work were found statistically significant differences in the production of onions in the individual genotypes on tested media.

**Keywords:** paclobutrazol, abscisic acid, CEPA, CO<sub>2</sub>, ethylene, sucrose, ELISA, DNA analysis

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABE, M., SHIBAOKA, H., YMANE, Y. and TAKAHASHI, N. Cell Cycle-dependent disruption of microtubules by methyl jasmonate in tablo BY-2 cells. *Protoplasma* 156, 1990, p. 1-8.
2. BERTACCINI, A., BOTTI, S., TABANELLI, D., DRADI, G., FOGHER, C., PREVIATI, A. and DA RE, F. Micropropagation and Establishment of Mite-Borne Virus-Free Garlic (*Allium sativum*). In: SCIENCE, Organising societies: Canadian Society for Horticultural a International Society for Horticultural Science. Conveners C.S. Vavrina ... [Vol. ed. S...]. NICOLA ..]. *Issues and advances in transpland production and stand establishment research: a proceedings of the XXVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada, 11-17 August, 2002 ; [proceedings of a Symposium on Issues and Advances in Transpland Production and Stand Establishment]*. Leuven: ISHS, 2004, p. 201-206. ISBN 9789066055575.
3. BERTACCINI, A., MARANI, F. and BORGIA, M. Shoot-tip culture of different garlic lines for virus elimination. IN: *Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, Italia, 1986, p. 97-105.
4. BHOJWANI, S.S. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci Hortic* 13, 1980, p. 47-52.
5. BHOJWANI, S.S., COHEN, D. and FRY, P.R. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. *Sci Hortic* 18, 1982/1983, p. 39-43.
6. BŘEZINOVÁ, Janka. Co nám dnes mohou nabídnout česnekové potravinové doplňky. In: "*Česnek ve 21. století*": sborník příspěvků ze semináře : *Regionální centrum Olomouc 16.5.2012*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, p. 66-73. ISBN 978-80-7427-102-1.
7. CONCI, V. and NOME, S. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *Phytopathol* 137, 1991, p. 186-192
8. Detection of antigens or antibodies by ELISA. *Vitology blog: About viruses and viral disease* [online]. 2010 [cit. 2015-02-29]. Dostupné z:

<http://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/>

9. DIRSCH, V.M. and VOLLMAR, A.M. Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) – like properties, *Biochemical Pharmacology*, 2001, p. 587-593.
10. DOSTÁL, Josef. *Nová květena ČSSR*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1989, p. 765-1548. ISBN 802000095x.
11. EDWARDS, Natasha; photographer Peter. *Garlic: the mighty bulb : cooking, growing and healing with garlic*. London: Kyle Books, 2012. ISBN 9780857830609.
12. ENGELAND, Ron and ANDERSON, Jim. *Suplement to the book Growing Great Garlic*. Okanogan: Filaree Production, 1995, 32 p.
13. ENGELAND, Ron L. *Growing great garlic: the definitive guide for organic gardeners and small farmers*. Okanogan, WA: Filaree Productions, 1991, xii, 213 p. ISBN 0963085018.
14. ETOH, T. and SIMON, P.W. Diversity, fertility and seeds production of garlic. In: RABINOWITCH, H.D. and CURRAH, L. [EDITORS. *Allium crop science: recent advances*. CAB International, Wallingford, 2002
15. FIŠEROVÁ, H., HRADILÍK, J., 1994. Produkce etylenu a etanu při tvorbě adventivních kořenů na stonkových segmentech révy vinné. (Ethylene and ethane production during adventitious root formation on vine stem segments) *Rostlinná výroba*, 40: p. 755 – 762.
16. FIŠEROVÁ, H., KULA, E., KLEMŠ, M., REINÖHL, V., 2001. Phytohormones as indicators of the degree of damage in birch. *Biológia*, 56/4: 405-409.
17. FIŠEROVÁ, H., MIKUŠOVÁ, Z., KLEMŠ, M. (2008). Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in plants by means. *Plant, Soil and Environment*. sv. 54, č. (2), p. 55--60. ISSN 1214-1178.
18. FIŠEROVÁ, H., SPÁLOVSKÝ, M., STAŇKOVÁ, Z., KOZÁK, V., KUDĚLKOVÁ, M., KŘIŽAN, B., HAVEL, L., 2012: *Role etylenu při kultivaci česneku v podmínkách in vitro*, Úroda. ISBN 0139-6013

19. FRITSCH, R.M. and FRIESEN, N. Evolution, domestication and taxonomy. In: RABINOWITCH, H.D. and CURRAH, L. [EDITORS. *Allium crop science: recent advances*. CAB International, Wallingford, 2002.
20. HAVEL, L., Diferenciace rostlin v explantátových kulturách druhů rodu *Allium* L. Kandidátská dizertační práce, ČSAV – Ústav experimentální botaniky, Praha, 1982, p. 1-221.
21. HAVRÁNEK, P., Proč je důležité o česneku vědět víc aneb o česneku pro pokročilé, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i, Olomouc, 2008. [online]. 2015 [cit. 2015-02-29]. Dostupné z: [http://www.k-cesnek.cz/ke-stazeni/Proc\\_je\\_dulezite\\_vedet\\_o\\_cesneku\\_vic.pdf](http://www.k-cesnek.cz/ke-stazeni/Proc_je_dulezite_vedet_o_cesneku_vic.pdf).
22. HAVRÁNEK, Pavel. Genofondová kolekce česneku v Olomouci: historie a výhledy do budoucnosti. In: *Historie a současný stav práce s genofondy v ČR: sborník referátů ze semináře konaného 11. listopadu 2001 ve VÚRV, pracoviště Olomouc*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2001, p. 80-86. ISBN 80-86555-14-3.
23. HAVRÁNEK, Pavel. Viruprosté klony česneku kuchyňského získané z meristematičtých kultur. In: "Ochrana rostlin": sborník UVTI 8, 1972, 291-298.
24. HEATH, O.V.S. Formative effects of environmental factors as exemplified in the development of the onion plant. *Nature* 155. 1945, p. 623-626.
25. HRADILÍK, Jan. *Rostlinné explantáty*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005, 85 p. ISBN 80-7157-915-7.
26. CHANEY, W.R., PREMACHANDRA, G.S., and HOLT, H.A. Physiological basis for benefits of tree growth regulators, pp 8-18 In: Proceedings, Eighth Annual Conference Western Plant Growth Regulator Society, Sacramento, California, 1996, p. 24-25.
27. JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Del La Societé Vaudoise Des Sciences Naturelles*, 44, 1908, p. 223-270.
28. KAHANE, R., RANCILLAC, M. a SCHWEISGUTH, B. Bulbing *in vitro* in *Allium* Species. *Allium Improvement*. 1992b, p. 18-20.

29. KAHANE, R., SCHWEISGUTH, B. and RANCILLAC, M. 1997. Trophic versus environmental factors controlling *in vitro* bulb formativ in onion and garlic micropropagated plants. Acta Hort. (ISHS) 433:435-444 [http://www.actahort.org/books/433/433\\_45.htm](http://www.actahort.org/books/433/433_45.htm).
30. KAZDA, Jan, Evženie PROKINOVÁ a Pavel RYŠÁNEK. *Škůdci a choroby rostlin: domácí rostlinolékař*. Vyd. 1. V Praze: Knižní klub, 2007, 288 p. Průvodce přírodou (Euromedia Group - Knižní klub). ISBN 978-80-242-1886-1.
31. KELLER, E.R. Joachim a Angelika SENULA. Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). In: LAMBARDI, Maurizio, Elif Aylin OZUDOGRU a S JAIN. *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. New York: Humana Press, c2013, p. 353-368. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 11013.
32. KEUSGEN, M. Health and alliums. In: RABINOWITCH, H.D. and CURRAH, L. [EDITORS. *Allium crop science: recent advances*. CAB International, Wallingford, 2002.
33. KODA, Y. and OKAZAWA, Y. Detection of potato tuber-inducing aktivty in potato leaves and old tubers, 1988, Plant Cell Physiol 29 (6), str. 629-633.
34. KODA, Y., OMER, E.A., YOSHIHARA, T., SHIBATA, H., SAKAMURA, S. and OKAZAWA, Y. Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves, 1988, Plant Cell Physiol 29 (6), p. 1047-1051.
35. KONVIČKA, Oldřich. *Česnek (Allium sativum L.): základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky*. Olomouc: vl.nákl., 1998, 167 p. ISBN 80-238-1928-3.
36. KOTKOVÁ, R., GROSPIETSCH, M., J. ZÁMEČNÍK. Kryokonzervace ozdravených genetických zdrojů česneku. In: "*Česnek ve 21. století*": sborník příspěvků ze semináře : Regionální centrum Olomouc 16.5.2012. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, p. 58-65. ISBN 978-80-7427-102-1.
37. KOTLINSKA, T., HAVRÁNEK, P., NAVRÁTIL, M., GERASIMOVA, L., PIMAKHOV, A. and NEIKOV, S.. Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in central Asia. In: *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources - Newsletter*. USSR: FAO, 1991, p. 31-32.

38. KOVÁČ, J., Explantátové kultury rostlin, Ústí nad Labem, 1992, ISBN 80-7044-036-8.
39. KOZÁK, Jan and KOZÁK, Václav. Šlechtění, odrůdová skladba, zkušenosti s pěstováním česneku. In: *Budúcnosť pestovania cesnaku v systéme trvalo udržateľneho poľnohospodarstva: Zborník odborných príspevkov z I. Celoslovenskej konferencie zo zahraničnou účasťou*. Dolné Srnie: Občianske združenie Slovensky cesnak, 2015, p. 4-10. ISBN 978-80-971924-0-2.
40. KOZÁK, Jan and ROD, Jaroslav. *Knihovnička zahrádkáře: Česnek*. Praha: T\_studio, s.r.o., 2011, 16 p.
41. KOZÁK, Jan. *Český česnek*. Praha: T-STUDIO, s.r.o., 2014, 34 p.
42. KRAJÍČKOVÁ, Jana. Ozdravování česneku. In: *"Česnek ve 21. století": sborník příspěvků ze semináře : Regionální centrum Olomouc 16.5.2012*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, p. 53-57. ISBN 978-80-7427-102-1.
43. KŘÍŽAN, B., ONDRUŠÍKOVÁ, E., KUDĚLKOVÁ, M., WASSERBAUEROVÁ, L., KRAJÍČKOVÁ, J., SMÉKALOVÁ, K. and DUŠEK, K. Metodika ozdravování česneku od virů pomocí kultivace meristému a *in vitro* kultur. Certifikovaná metodika, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010b.
44. KUDĚLKOVÁ, M. Virové choroby česneku kuchyňského. In: *"Česnek ve 21. století": sborník příspěvků ze semináře : Regionální centrum Olomouc 16.5.2012*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, p. 31-39. ISBN 978-80-7427-102-1.
45. KUTINA, Josef. *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. 1. vyd. Praha: SZN, 1977, 405 p.
46. LEPITAN, V.P.C., PATENA, F.L. Bulblet formativ *in vitro*, a new approach to garlic (*Allium sativum* L.) „basic seed“ production, Philipp, J. Crop Science 17 (2), 1992, p. 89-94.
47. LUŠTINEC, J. and ŽÁRSKÝ, V. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 261 p. ISBN 8024605635.



48. MA, K.H., KWAG, J.G., ZHAO, W., DIXIT, A., KIM, H.H., LEE, G.A., KIM, N.S., LEE, J.S., JI, J.J., KIM, T.S., PARK, Y.J. and CHUNG, I.M. Isolation and characteristic of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 122, 2009, p. 355-361.
49. MANN, L.K. a MINGES, P.A. Growth and bulbing of garlic (*Allium sativum* L.) in response to storage temperature of planting stocks, day length, and planting date. *Hildegardia*. 1958, p. 385-419.
50. MANN, L.K.. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hildegardia*. 1952, p. 195-251.
51. MARANI, F. and BERTACCINI, A. Risanamento dell'infazione virale dall'aglio mediante coltura di apici meristemati. IN: *Atti Giornate Fitopatologiche*, Supplemento, 1980, p. 23-30.
52. MATHEW, B. *A review of Allium section Allium*, Richmond, Royal Botanic gardens, Kew, 1996
53. MEREDITH, Ted. *The complete book of garlic: a guide for gardeners, growers, and serious cooks*. Portland: Timber Press, 2008, 330 p. ISBN 0881928836.
54. MORICONI, D., CONCI, V. and NOME, S. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton* 51, 1990, p. 145-151.
55. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 1962, p. 473-497.
56. NAGAKUBO, T., NAGASAWA, A., and OHKAWA, H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993, p. 175-183.
57. NARVA: Zářivkové trubice. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: [http://narva.cz/\\_files/narva.cz/zarivky-narva-2011.pdf](http://narva.cz/_files/narva.cz/zarivky-narva-2011.pdf)
58. NOVÁK, František Jindřich. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1990, 208 p. ISBN 8020003444.
59. ONDRUŠÍKOVÁ, E., SASKOVÁ, H., ČECHOVÁ, J., KŘIŽAN, B. The effect of genotype on sanitation of garlic plants (*Allium sativum* L.). In: *New*

*developments in green gene technology*, Hungary, Hungarian Academy of Sciences, 2009.

60. PARTHIER, B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: Many facts and few hypotheses on their action. 1991, *Botanical Acta* 104, p. 405-464.
61. PETŘÍKOVÁ, Kristína and HLUŠEK, Jaroslav. *Zelenina: pěstování, výživa, ochrana a ekonomika*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2012, 191 p. ISBN 978-80-86726-50-2.
62. PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. In: *Martinus Nijhoff Publishers*, 1987, Dordrecht.
63. POWELL, W., et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996, vol. 2, issue 3, p. 225-238. DOI: 10.1007/BF00564200.
64. PRINGLE, C.R. Virus taxonomy. IN: *Virology division news*, San Diego, 1998, *Archives Virol* 143, p. 7.
65. PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998, p. 484, ISBN 8020005862.
66. PROKEŠ, J., FIŠEROVÁ, H., HELÁNOVÁ, A., HARTMANN, J.: Význam oxidu uhličitého a ethylenu v procesu sladování, *Kvas. Prům.*, 52, 2006, 11-12, 349
67. RACCA, R., LEDESMA, A., REALE, M. and COLLINO, I. Efecto de bajas temperatura sen almacenaje de preplantación y condiciones termo-fotoperiódicas de cultivo en la bulbificación de ajo (*Allium sativum* L.), 1981, *Rosado Paraguayo, Phytion* 44, p. 77-82.
68. RANDLE, W.M. and LANCASTER, JE. Sulphur compounds in alliums in relation to flavon quality. In: RABINOWITCH, H.D. and CURRAH, L. [EDITORS. *Allium crop science: recent advances*. CAB International, Wallingford, 2002.

69. RAVNIKAR, M., ZEL, J., PLAPER, I. And SPACAPAN, A. Jasmonic acid stimulans shoot and bulb formatin of garlic *in vitro*. IN: *Plant Growth Regulators*, 1993, p. 73-77
70. ROD, Jaroslav. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy: ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany rostlin*. Brno: Biocont Laboratory, c2005, 392 p. ISBN 8090187439.
71. ROKSANA, R., ALAM, M.F., ISLAM, R., HOSSAIN, M.M. *In vitro* bulblet formativ from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Tissue Cult.* 12 (1), 2002, p. 11-17.
72. ROSSI JAUME, A., ABDALA, G., TIZIO, R., CORRALI, M. and GROSSO. Possible involvement of jasmonic acid in bulb forming of garlic (*Allium sativum* L.). In: CONVENER, J a J [EDITORS. *First International Symposium on Edible Alliaceae, Mendoza, Argentina, 14-18 March 1994*. Leuven, Belgium: ISHS Section Vegetables, 1997, p. 381-388. ISBN 9789066057999.
73. RYAN, C.A. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. 1992, *Plant Molecular Biology*, p. 123-133.
74. SHIBAOKA, H. The role of gibberellin in the formativ of onion bulbs. In: TAKAHASHI, N., PHINNEY, B.O. and MACMILLAN, J. [EDITORS. *Gibberellins*, p. 220-228, 1990, Springer-Verlag, New York.
75. SCHLOUPF, R., BARRINGER, S. and SPLITTSTOESSER, W. A review of hyperhydricity (vitrification) in tissue culture. *Plant Growth Regul Soc Am Q* 23, 1995, p. 149-159.
76. SRIVASTAVA, K.C., BORDIA, A. and VREMA, S.K. Garlic (*Allium sativum* L.) for disease preventiv, IN: *S. Afr. J. Science* 91, 1995, p. 68-77.
77. STAŇKOVÁ, Zuzana. *Exogenní a endogenní faktory tvorby cibule u česneku kuchyňského v podmínkách in vitro*. Lednice, 2014. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici.
78. STAVĚLÍKOVÁ, H. and ZÁMEČNÍK, J. Current status of the long-day *Allium* collection in the Czech Republic. Report of a Vegetables Network, International Plant Genetic Resources Institute, Rome – Italy, 2005, p. 22-24.

79. STAVĚLÍKOVÁ, Helena. Genetické zdroje česneku v České republice. In: "Česnek ve 21. století": sborník příspěvků ze semináře : Regionální centrum Olomouc 16.5.2012. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, p. 2-6. ISBN 978-80-7427-102-1.
80. TAKAGI, H., and YU, Y. Effects of light quality, fotoperiod and cold treatment on *in vitro* bulbing of garlic shoot tip. In: CONVENERS, Toyoki Kozai and Toyoki Kozai [EDITORS. *Environmental effects and their control in plant tissue culture XXIVth International Horticultural Congress, Kyoto International Conference Hall, 21-27 August 1994, Kyoto, Japan*. Leuven, Belgium: International Society for Horticultural Science, 1995, p. 181-188. ISBN 9789066054769.
81. TANCIK, Ján. Škudcovia cesnaku a zmena klímy. In: *Budúcnosť pestovania cesnaku v systéme trvalo udržateľného poľnohospodarstva: Zborník odborných príspevkov z I. Celoslovenskej konferencie zo zahraničnou účasťou*. Dolné Srnie: Občianske združenie Slovensky cesnak, 2015, p. 11-24. ISBN 978-80-971924-0-2.
82. TAUTZ, D., TRICK, M. and DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*. 1986, č. 322, p. 14 – 20.
83. UCMAN, R., ZEL, J. and RAVNIKAR, M. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formativ *in vitro*. In: *Scientia Horticulture*, 1995, p. 68-77.
84. UCMAN, R., ŽEL, J. and RAVNIKAR, M. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formativ *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 1998, p. 193-202.
85. VERBEEK, M., VAN DIJK, P. and VAN WELL, P.M.A. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum* L.) by meristem-tip culture, IN: EUR, J. *Plant Pathology 101*, 1995, p. 231-239
86. VVEDENSKY, AI. The genus *Allium* in the USSR, *Herbetia*, 1946, 65-218
87. WHITE, J.C., MEDLOW, G.C., HILLMAN, J.R., WILKINS, M.B. Correlative inhibition of laterál bud growth in *Phaseolus vulgaris* L., Isolation of indoleacetic acid from the inhibitory region, *J. Exp. Botanic*, 1975, p. 419-424.

88. WU, M., CHEN, L. J., LONG, Y. J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. IN: *In vitro Cell. Dev. Bol. Plant*, 2009, p. 483-490
89. XU, X., LAMMEREN, A., VERMEER, E. and VREUGDENHIL, D. The Role of Gibberellins, Abscisis Acid, and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation in Vitro. *Plant Physiology* 117(2), 1998, p. 575-584.
90. ZÁMEČNÍK, Jiří. *Konzervace genetických zdrojů Allium pomocí kryoprezervace: certifikovaná metodika*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012, 14 p. ISBN 978-80-7427-086-4.

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### Seznam obrázků:

Obr. 1: Popis stavby stroužku podle Havránka

Obr. 2: Pohled do stereomikroskopu na zatahovací kořeny česneku

Obr. 3: Pacibulky česneku 'Blanin II' a sterilní květní poupata

Obr. 4: Česnek napadený vlnovníkem

Obr. 5: List s příznaky napadení virózami

Obr. 6: Cibule česneku s označením Emilia

Obr. 7: Skleněná kádinka s 1 ml 1% flordimexu a naklíčenými obilkami umístěná uvnitř kultivační nádoby

Obr. 8: Odřezávání segmentu stroužku určeného pro založení nové in vitro kultury

Obr. 9: Explantátová laboratoř šlechtitelské instituce Ing. Jana Kozáka

Obr. 10: Probíhající elektroforéza

Obr. 11: Emilie na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury

Obr. 12: Emilie na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury

Obr. 13: Emilie na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury

Obr. 14: Emilie na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury

Obr. 15: Emilie na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury

Obr. 16: Emilie na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury

Obr. 17: Emilie na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury

Obr. 18: Emilie na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury

Obr. 19: 'Japo' na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury

Obr. 20: 'Japo' na kontrolním mediu 5 měsíců po založení kultury

Obr. 21: 'Japo' na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury

- Obr. 22: 'Japo' na MS mediu s PP 333 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 23: 'Japo' na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 24: 'Japo' na MS mediu s ABA 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 25: 'Japo' na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 26: 'Japo' na MS mediu s CEPA 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 27: 'Japo' na MS mediu s 80 g/l sacharózy 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 28: 'Japo' na MS mediu s 80 g/l sacharózy 5 měsíců po založení kultury
- Obr. 29: Dendrogram analyzovaných genotypů a klonů česneku Emilia a 'Japo'
- Obr. 30: Polyakrylamidový gel
- Obr. 31: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM1
- Obr. 32: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM2
- Obr. 33: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s 80 g/l sacharózy
- Obr. 34: Emilia 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s PP 333
- Obr. 35: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM1
- Obr. 36: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na kontrolním mediu ZM2
- Obr. 37: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s 80 g/l sacharózy
- Obr. 38: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s PP 333
- Obr. 39: 'Japo' 8 měsíců po založení kultury při kultivaci na MS mediu s ABA
- Obr. 40: Emilie v malé zkumavce pro založení kultury (vpravo – stáří explantátu 4 měsíce) a ve zkumavce pro následnou kultivaci (vlevo - stáří explantátů 1 rok)
- Obr. 41: Cibulky Emilie 14 dní po převodu do nesterilních podmínek a pěstování pod umělým osvětlením
- Obr. 43: Cibulky převedené z in vitro podmínek do substrátu - 65 dní po převodu

### **Seznam tabulek:**

Tab. 1: Varianty složení medií pro kultury založené ze segmentů stroužků

Tab. 2: Varianty složení medií pro kultury založené z meristému

### **Seznam grafů:**

Graf 1: Vliv růstových regulátorů na tvorbu etylenu kultivovanými rostlinami česneku

Graf 2: Vliv růstových regulátorů na tvorbu CO<sub>2</sub> kultivovanými rostlinami

Graf 3: Vliv růstových regulátorů na tvorbu cibulek

Graf 4: Vliv růstových regulátorů na multiplikaci cibulek

Graf 5: Vliv chladového skladování cibulek Emilie před převodem do *in vivo* podmínek



## **10 PŘÍLOHY**

Příloha č. 1: Fotografický množitelský protokol zakládání *in vitro* kultur ze segmentů vnitřní části stroužku

Příloha č. 2: Článek - Role etylenu při kultivaci česneku v podmínkách *in vitro* (Úroda 9, 2012)

Příloha č. 3: Poster - Role etylenu při kultivaci česneku v podmínkách *in vitro*

Příloha č. 4: Článek - Vliv genotypu česneku na tvorbu cibulí v podmínkách *in vitro*