



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Mikropropagace ořešáku královského

(*Juglans regia*, Linnaeus, 1753)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Ludvík Urda
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Holub
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ludvík Urda
Název práce	Mikropropagace ořešáku královského (<i>Juglans regia</i> , Linnaeus, 1753)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Jan Holub s.r.o., www.janholub.cz
Vedoucí práce	Mgr. Jan Holub
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Ořešák královský (<i>Juglans regia</i>, L.) je strom pro člověka velmi důležitý a komerčně pěstovaný zejména pro jeho nutričně bohaté plody. Mikropropagace rostlin <i>in vitro</i> je rozšiřující se laboratorní metodika pro množení rostlin. Vegetativní množení ořešáku královského je nesmírně složitý a nákladný proces a aplikace <i>in vitro</i> mikropropagace by proces množení zjednodušila, zlevnila a zkrátila. Předložená diplomová práce se zaměřuje na aplikaci metodiky mikropropagace <i>in vitro</i> a vytvoření stabilní explantátové kultury ořešáku královského.</p>
Klíčová slova	ořešák královský, <i>in vitro</i> , mikropropagace, <i>juglans regia</i> , explantátové kultury
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ludvík Urda
Title of thesis	Micropropagation of Persian walnut (<i>Juglans regia</i> , Linneus, 1753)
Type of thesis	Diploma
Department	Jan Holub s.r.o, www.janholub.cz
Supervisor	Mgr. Jan Holub
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Persian walnut (<i>Juglans regia</i>, L.) is a tree of great importance for human and is commercially cultivated mainly for its fruits, which have high nutrition content. <i>In vitro</i> plant micropropagation is expanding method for plant multiplication. Clonal multiplication of Persian walnut is very difficult and expensive process and application of micropropagation would make this process easier, cheaper and shorter. This thesis is focused on application of <i>in vitro</i> micropropagation method and creating stable tissue culture of Persian walnut.</p>
Keywords	Persian walnut, <i>juglans regia</i> , micropropagation, <i>in vitro</i> , tissue culture
Number of pages	77
Number of supplements	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury a pod odborným dohledem pana Mgr. Jana Holuba.

V Olomouci dne

Děkuji panu Mgr. Janu Holubovi za předání odborných znalostí k tématu mikropropagace a za poskytnutí svých materiálů a prostorů pro uskutečnění praktické části své diplomové práce.

OBSAH

Seznam zkratk.....	8
Seznam obrázků.....	9
1 Úvod.....	11
2 Ořešák královský.....	13
2.1 Taxonomie a morfologie.....	13
2.2 Hospodářský význam.....	14
2.3 Odrůdy vhodné pro pěstování v České republice.....	16
2.3.1 Zóny rostlinné odolnosti (USDA Hardiness Zones).....	20
2.4 Rozmnožování Ořešáku královského.....	22
2.4.1 Apomixie.....	22
2.4.2 Roubování.....	23
2.4.3 Řízkování.....	24
2.4.4 Rozmnožování <i>in vitro</i>	25
3 Metoda práce – Mikropropagace.....	26
3.1 Metodika.....	26
3.2 Využití.....	27
4 <i>In vitro</i> množení ořešáku královského.....	28
4.1 Média a růst.....	28
4.2 Odvozování sterilní kultury.....	31
4.2.1 Průběh odvozování sterilní kultury ořešáku královského.....	31
4.2.2 Problémy při odvozování sterilní kultury ořešáku královského.....	32
4.3 Tvorba kořenového systému.....	34
5 Význam množení Ořešáku královského <i>in vitro</i>	37
6 Postup experimentu.....	40
6.1 Seznam použitých pomůcek a chemikálií.....	40
6.2 Fáze I – Odvození sterilní explantátové kultury z matečné rostliny.....	40
6.3 Fáze II – Optimalizace kultivačních podmínek pro množení ořešáku královského pomocí mikropropagace.....	44
6.4 Fáze III – Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách.....	47
7 Výsledky.....	57

7.1	Fáze I – Odvození sterilní explantátové kultury z matečné rostliny.....	57
7.2	Fáze II – Optimalizace kultivačních podmínek pro množení ořešáku pomocí mikropropagace.....	59
7.3	Fáze III – Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách	62
8	Diskuse.....	67
9	Závěr	73
10	Seznam literatury.....	74

Seznam zkratek

BA	6-benzylaminopurin
DKW	Driver Kuniyuki Walnut médium (Driver a Kuniyuki, 1984)
Fe-EDDHA	Železitá sůl kyseliny ethylendiamin-di-2-hydroxy-phenyl octové
IBA	Indol-3-butyric acid (kyselina indolylmáselná)
MS	Murashige/Skoog médium (Murashige, Skoog, 1962)
mT	Meta-Topolin [6-(3-hydroxybenzylamino)purin]
PPM TM	Plant Preservation Mixture (Biotech.cz)
USDA	United States Department of Agriculture

Seznam obrázků

- Obr. 1 - Morfologie ořešáku královského (*Juglans regia*, L.). Převzato a upraveno z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juglans_regia_K%C3%B6z%C3%B6ns%C3%A9ges_di%C3%B3.jp 14
- Obr. 2 - Plod ořešáku královského (*Juglans regia*, L var. *Alsoszentivani*) a čerstvé jádro v něm obsažené (vpravo), určený pro přímou konzumaci, či jiné zpracování. Plod ořešáku královského (*Juglans regia* var. *Rosetta*) (vlevo) s vyšlechtěnými červenými jádry určené převážně pro cukrářský průmysl. Převzato a upraveno z: <http://www.lubera.co.uk/plants/ornamental-plants-for-outdoors/wild-shrubs-bushes/walnut-rosette-red-nuts> 15
- Obr. 3 - Zóny teplotní odolnosti rostlin v České republice podle (PlantMaps, 2018). Obrázek přejet a upraven z: <http://www.plantmaps.com/interactive-czech-republic-plant-hardiness-zone-map-celsius.php> 21
- Obr. 4 - Morfologie čerstvě srostlé roubované rostliny ořešáku královského (maďarský kultivar *Alsoszentivani*) 24
- Obr. 5 - Viditelné rozšíření vnitřní kontaminace v podobě bakteriální kultury do kultivačního média u explantátu ořešáku královského, odvozeného z nesterilních přírodních podmínek a kultivovaného experimentálně na médiu J4. Tento explantát byl nakonec vlastní kontaminací zahuben v časovém intervalu několika dní. 33
- Obr. 6 - Výsledek v experimentu zakořeňování explantátů ořešáku a výsledné kořenové systémy podle (Vadhati, et al., 2004) 36
- Obr. 7 - Kořenový systém tříletého pravokořenného ořešáku královského kultivar *Vina* (Lopez, 2004) 38
- Obr. 8 - Vícenodální segmenty ořešáku královského kultivaru *Seifersdorfský*, kultivované na médiu J5 v roce 2017. 42
- Obr. 9 - Segmenty ořešáku královského použity pro odvozování sterilní kultury in vitro v roce 2018. 43
- Obr. 10 - Jednonodální segmenty kultivaru *Mars* kultivované na médiu J5 v uzavíratelných plastových zkumavkách. 43
- Obr. 11 - Rostlinky ořešáku královského převedené ze sterilních podmínek in vitro do podmínek nesterilních a kultivované po dobu jednoho měsíce v zahradnickém substrátu v průhledné nádobě překryté pórovitou fólií k zajištění vyšší vzdušné vlhkosti. 56

Obr. 12 - Částečně nekrotizovaný (vlevo) a zcela zdravý (vpravo) jednonodální segment, použity jako explantáty vhodné k odvozování sterilní kultury. Tyto explantáty byly kultivovány na médiu J5 po dobu tři dnů.	58
Obr. 13 - Zcela nekrotický explantát vytvořený z apikální části juvenilního prýtu kultivaru Mars, kultivovaný po dobu jednoho týdne na médiu J5.	58
Obr. 14 - Rašící jednonodální segmenty ořešáku královského kultivaru Jupiter, které jsou kultivované na médiu J5 po dobu tří týdnů.	59
Obr. 15 - Explantáty semenáče S2, které byly na médiu kultivované po dobu tří týdnů.	60
Obr. 16 - Explantáty ořešáku královského semenáče S4 kultivované na médiu J4 po dobu 14 dní.	61
Obr. 17 - Detail vyšší schopnosti rozvětvovat se u explantátů ořešáku královského semenáče S4 kultivované na médiu J4.	61
Obr. 18 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.1 a Jex.1	62
Obr. 19 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.1 a Jex.2	63
Obr. 20 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.2 a Jex.1	63
Obr. 21 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.2 a Jex.2	64
Obr. 22 - Kontaminace na médiu Jex.1 v experimentu dvoufázového zakořeňování explantátů semenáče S4 na médiích Jin.3 + Jex.1, která zapříčila smrt všech čtyř explantátů.	64
Obr. 23 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.3 a Jex.2	65
Obr. 24 - Rostlinky semenáče S4 s plně vyvinutým kořenovým systémem, které byly zasazeny do květináčů a zahradnického substrátu a vysazeny k dalšímu růstu do skleníku.	66
Obr. 25 - Přeživší rostlina semenáče S4, která přežila zimu a úspěšně roste v nesterilních podmínkách.	66

1 Úvod

Ořešák královský (*Juglans regia*, Linnaeus, 1753) je strom s dlouholetou tradicí pěstování. Jedná se o rostlinu vyhledávanou zejména pro její produkci chutných a nutričně velmi bohatých plodů, známé jako vlašské ořechy. Tyto ořechy jsou bohatým a koncentrovaným zdrojem vitamínů, nenasycených mastných kyselin, minerálů a bílkovin.

Ořech však nenachází své využití pouze v potravinářství, ale i v jiných a neméně důležitých odvětvích. Látky obsažené v listech ořešáku či slupkách lze využít jako barvivo, či účinné látky ve farmacii. Dřevo ořešáku královského se považuje za jedno z nejvyhledávanějších a známá „kořenice“ je jedna z nejcennějších částí ořešáku pro výrobu dekorativního nábytku. Využití ořešáku královského je skutečně rozsáhlé, a proto je o jeho pěstování i nadále velký zájem.

Pro komerční prodej rostlin je důležité zachování odrůdové stálosti a toho lze dosáhnout pouze vegetativním množením daného rostlinného druhu. Musíme tedy vytvořit klony, abychom zajistili, že potomstvo bude genotypově identické.

Vegetativní množení ořešáku královského je velmi složitý, nákladný a časově náročný proces a v dnešní době známe prakticky jen jeden osvědčený a funkční postup, a tím je roubování certifikovaných odrůd na podnože vypěstované ze semenáče ořešáku. I roubování je však postup náročný a drahý, a proto je žádoucí zkoumat jiné metody vegetativního množení ořešáku, které by jejich produkci zjednodušilo.

Mikropropagace *in vitro*, nebo také tvorba explantátových kultur, je metoda vegetativního množení rostlin ve zkumavce. V praxi to znamená oddělit ze sterilně vypěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek.

Předkládaná diplomová práce řeší právě metodiku *in vitro* mikropropagace aplikovanou na vegetativní množení ořešáku královského ve sterilních podmínkách. Úplné zvládnutí *in vitro* mikropropagace a úspěšné vegetativní rozmnožení ořešáku královského lze rozdělit na více dílčích kroků, které vystihují cíle této diplomové práce.

Cíle práce

1. Zpracování literárního přehledu o problematice pěstování ořešáku královského pomocí techniky *in vitro* mikropropagace.
2. Odvození sterilní explantátové kultury ořešáku z matečné rostliny.
3. Optimalizace kultivačních podmínek pro množení ořešáku pomocí mikropropagace.
4. Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách.

2 Ořešák královský

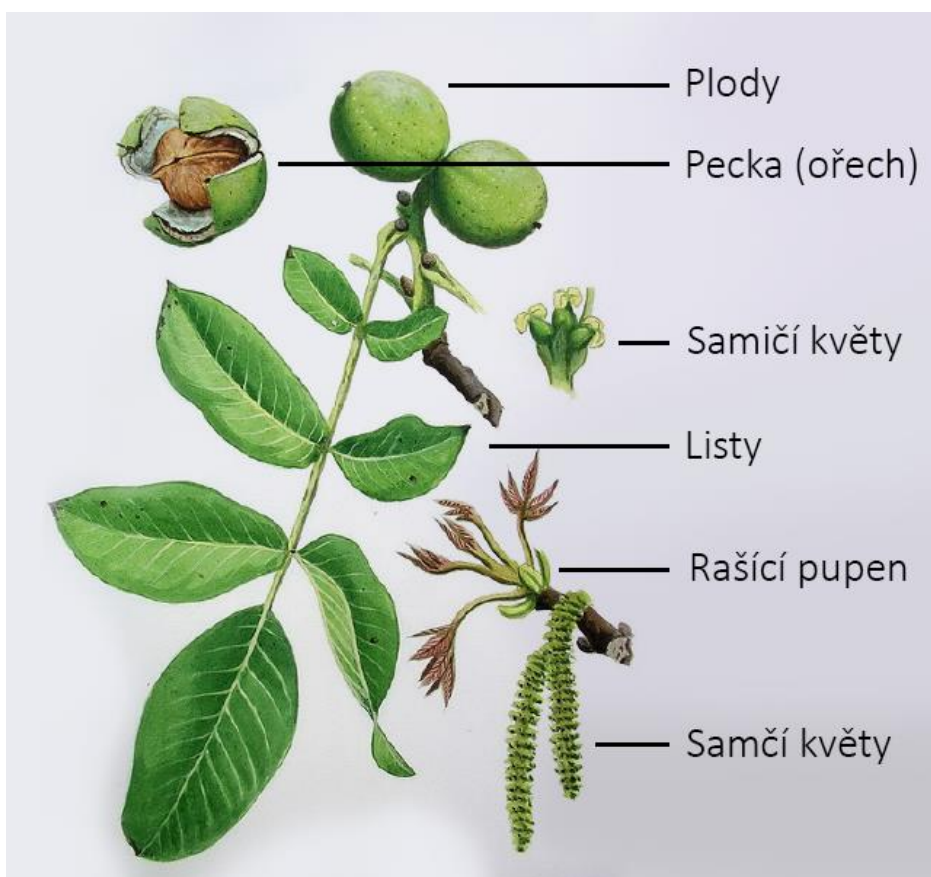
2.1 Taxonomie a morfologie

Ořešák královský (*Juglans regia*, Linnaeus, 1753), známý také jako ořešák vlašský, či ořešák perský, je taxonomicky klasifikován do říše *Plantae*, oddělení *Magnoliophyta*, třídy *Rosopsida*, řádu *Fagales*, čeledi *Juglandaceae* a do rodu *Juglans*. Samotný rod *Juglans* zahrnuje 21 dlouhověkových opadavých stromů obecně označovaných jako ořešáky. Tento strom roste původně na východu Balkánu po Himaláj, až po jihovýchodní Čínu (Al-Mizory, Azad, 2012). Největší lesy, které jsou v mnoha případech i čistě ořešákové, se nachází v Kyrgyzstanu v nadmořských výškách 1000 – 2000 metrů nad mořem (Al-Mizory, Azad, 2012). Mezi nejdůležitější patří *Juglans regia* L. (ořešák vlašský, persian walnut), *Juglans nigra* L. (ořešák černý, eastern black walnut) a *Juglans cinerea* L. (ořešák popelavý, butternut), které jsou považovány za podstatné v komerční produkci ořechů (Payghamzadeh, et al., 2011).

Ořešáky jsou krytosemenné, opadavé, pomalu rostoucí, mohutné stromy rostoucí do výšky až 45 metrů. Kůra stromů je v mládí hladká a stříbřitá, starší stromy mají kůru hluboce brázditou. Listy jsou vejčité lichozpeřené a, spolu s dalšími částmi rostlin, vydávají charakteristické aroma. Ořešáky jsou stromy jednodomé (monoické). Samčí květy tvoří jehnědy, které obsahují pouze tyčinky, samičí plody jsou spíše nenápadné a obsahují pouze pestíky (Obr. 1).

Samčí květenství tvoří svůj základ již v červnu až červenci, kdy vytvoří v paždí listů prašníkové pupeny, které vydrží až do jara následujícího roku, na rozdíl od samičích květů, které se vyvíjejí až na jaře z nově rostoucích letorostů (Jabůrek, 2008).

Samčí květenství je původně klas, jelikož je ale hlavní vřeteno slabě převislé, je označován jako jehněda. Plody, které se klasifikují jako peckovice, jsou nesprávně označovány jako ořechy (Jabůrek, 2008). Plody mají zelené oplodí, které zakrývá hnědou skořápku, skrývající semeno (Hladík, 1966). Plody, tedy peckovice (*drupa*), má oplodí (*pericarp*) rozdělené na tři základní vrstvy: vnější tenkou, zpočátku zelenou slupku (*epikarp*), dužnatý (*mezokarp*) a sklerenchimatický tvrdý (*endokarp*) (Obr.1), který tvoří pecku uzavírající semeno („jádro ořechu“) (Jabůrek, 2008).



Obr. 1 - Morfologie ořešáku královského (*Juglans regia*, L.). Převzato a upraveno z:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Juglans_regia_K%C3%B6z%C3%B6ns%C3%A9ges_di%C3%B3.jp

2.2 Hospodářský význam

Ořešák královský je jako strom a jeho produkty velmi využíváný, a to v mnoha směrech. Vlašský ořešák lze použít jako strom ovocný, lesní, alejový, parkový, či dekorační. Dřevo je ceněné v nábytkářství, produkty metabolismu například v léčitelství. Hospodářský význam stromu *Juglans regia* je velmi rozmanitý, ovšem největší a nejrozšířenější význam ořešáku mají jádra jeho plodů (Obr. 2).



Obr. 2 - Plod ořešáku královského (*Juglans regia*, L var. Alsoszentivani) a čerstvé jádro v něm obsažené (vpravo), určený pro přímou konzumaci, či jiné zpracování. Plod ořešáku královského (*Juglans regia* var. Rosetta) (vlevo) s vyšlechtěnými červenými jádry určené převážně pro cukrářský průmysl. Převzato a upraveno z: <http://www.lubera.co.uk/plants/ornamental-plants-for-outdoors/wild-shrubs-bushes/walnut-rosette-red-nuts>

Jádra mají největší hospodářský význam v potravinářském odvětví. Suchá jádra jsou velmi nutričně bohatou potravinou, obsahující nejdůležitější živiny, které člověk nezbytně potřebuje ke svému životu. Celkově lze říci, že 100 g sušených jader se vyrovná nutričně asi dvěma kilogramům jádrového ovoce, které obsahuje velké množství vody (Šobek, 1958).

Jádra ořešáku jsou bohatá na různé vitamíny. Například čerstvý plod, vážící 15 g, obsahuje asi 0,30-0,50 mg vitamínu C. Ve 100 g čerstvých jader je kromě vitamínu C ještě asi 0,25 mg vitamínu B1, stopy B2 a karotenu (Hilkenbäumer, 1953). Vlašské ořechy jsou bohatým zdrojem nenasycených mastných kyselin, například α -linolenová kyselina. Mají i vysoký obsah bílkovin a minerálů, například draslíku a hořčíku. Bílkoviny v jádrech jsou svým složením podobné bílkovinám v mléce a jejich obsah se pohybuje v rozmezí 15 – 22 % v poměru k váze suchého jádra (Šobek, 1958).

Velmi důležité sloučeniny obsažené v jádrech jsou aminokyseliny (kyselina glutamová, arginin a leucin) a tuky. Množství tuku v jádrech je kolísavé. Závisí na odrůdě, klimatu a stanovišti ořešáku. Nejvyšší procento tuků je cca 68 % a průměr bývá 54,5 % (Šobek, 1958). Ořechy jsou značně obohaceny o omega-3 a omega-6 mastné kyseliny, které jsou pro člověka esenciální (Amaral, *et al.* 2003). Olej získaný ze suchých jader je velmi jemný, rychle vysychavý a má chuť a vůni mandlového oleje. Hodí se proto k přípravě jídel, k výrobě léčiv, mýdel, barev atd. (Šobek, 1958). Podle (Heupke, 1951) obsahuje 100 g jader konkrétně následující složky:

7,1 g H₂O; 17,4 g bílkovin; 62,2 g tuku; 7,2 g glycidů; 3,2 g celulózy; 372 mg K₂O, 13 mg Na₂O, 200 mg CaO; 116 mg MgO a 405 mg P₂O₅.

Kromě svých výrazných nutričních hodnot jsou vlašské ořechy používány v cukrářském průmyslu jako dekorační doplňky, a to nejčastěji odrůdy speciálně vyšlechtěné tak, aby jejich jádra měla červenou barvu (Obr. 2). Tyto odrůdy jsou pro cukráře atraktivní a jejich nutriční hodnoty se neliší od jader ořechů klasické hnědé barvy.

Vlašské ořechy se považují za nejlepší řešení při prevenci koronárních onemocnění srdce. Bylo zjištěno, že pravidelná konzumace ořechů příznivě mění lipoproteinový profil člověka a zároveň snižuje hodnoty škodlivého cholesterolu (Amaral, *et al.*, 2003). Jedná se tedy ze všech stran o velmi prospěšnou potravinu.

Vlašské ořechy a jiné produkty stromu se využívají i mnoha jinými způsoby než jen v potravinářství. Skořápky plodů jsou dobrým palivem a vyrábí se z nich aktivní uhlí. Zelený obal plodů obsahuje velké množství vitamínu C (1050–3036 mg), který je ovšem složité vyextrahovat do požitelné podoby (Zarubin, 1954). Dále je v zeleném obalu obsaženo hnědé barvivo, které se používá k barvení hedvábí, vlny, kůže, dřívě i vlasů.

Dřevo ořešáků svou jakostí předčí dřevo většiny u nás rostoucích dřevin. Je pevné, trvanlivé, jemně vláknité, rovnoměrně husté, dobře lešitelné, tuhé a nepříliš ohebné (Šobek, 1958). Pro všechny tyto vlastnosti je ořešákové dřevo jedním z nejcennějších pro nábytkářský průmysl. Ořešákový nábytek je po celém světě oblíbený a poptávka je stálá.

2.3 Odrůdy vhodné pro pěstování v České republice

V České republice existuje velké množství odrůd, které jsou pro naše podmínky ideální, či se v naší zemi přímo vyšlechtily. Mezi nejznámější odrůdy v České republice patří odrůdy Apollo, Mars, Jupiter a Sefiersdorfský.

- **Apollo**

- Jedná se o bujně rostoucí strom, částečně samosprašný, s mohutnou korunou, tzn. odrůda vhodná do větších zahrad. Je to strom částečně samosprašný. Plody má velké, typem skořápky se řadí do polopapíráků. Doporučuje se pro teplejší oblasti, jeho rané rašení může být ohroženo jarními mrazíky (Dvořák, 1978, DeSmallekamp.nl, 2018). Jeho přednosti jsou bujný zdravý růst, dobrá plodnost a velké plody s velkým obsahem jádra. Naopak jeho nedostatek je velký obsah vody v plodech, a proto je třeba včasné sušení ihned po sklizni (Dvořák, 1978).

- **Mars**
 - Květenství této odrůdy je proterogynické, doba kvetení samčích a samičích květů schopných opylení se částečně kryje, proto je možné velmi dobré samoopylení. Stromy jsou středně bujné až bujné s jádry velkými s velkým poměrem jádra ku skořápce. Tato odrůda rodí velmi brzy, a to již cca ve 3. roce po výsadbě. Plodí dobře a pravidelně. Je to strom, který raší velmi pozdně, tedy jarní mrazíky jej nemůžou ohrozit a je vhodný i do chladnějších podmínek (Dvořák, *et al.*, 1978).

- **Jupiter**
 - Cizosprašná odrůda vyšlechtěná ve Valticích. Jedná se o středně velký strom s širokou korunou. Přednostmi jsou dobrý a zdravý růst, řídká koruna a velké plody s velkým podílem jádra, které navíc zrají stejnoměrně. Tato odrůda má také plody s vysokým obsahem vody, a proto je třeba je ihned sušit. Jedná se o odrůdu, která se může pěstovat ve všech místech naší republiky. Je to odrůda vhodná do zahrad i pro velkovýsadbu (Dvořák, *et al.*, 1978).

- **Seifersdorfský**
 - Jedná se o samosprašnou odrůdu s velkými plody s velkým obsahem jádra. Velmi dobře plodí, ale jeho skořápka je poněkud tvrdší než u všech výše zmíněných odrůd. Stromy této odrůdy jsou středně dobře až dobře odolné proti mrazům (Jan, 2012).

- **Saturn**

- Tato částečně samosprašná odrůda roste bujně hlavně v mládí. Má plody středně velké s polopapírovou skořápkou. Začíná plodit asi ve 4. roce po výsadbě a jeho plodnost je středně pozdní. Vyžaduje svahovité otevřené plochy a vysoký půdní profil. Je dostatečně odolný proti zimním mrazům, ale jarní mrazíky jej mohou ohrozit, jelikož raně raší. Také výtěžnost jádra je nižší z důvodu nepatrného zasychání (Dvořák, *et al.*, 1978).

Popsané odrůdy jsou velmi vhodné do našich podmínek, ovšem existuje velké množství odrůd stejně dobrých, ne-li lepších, které se v našich podmínkách nepěstují mnohdy z důvodu neznalosti dané odrůdy, či z důvodu přehnané konzervativnosti českého národa. Odrůdy zmíněné v (Tab. 1) v jiných zemích prodávají běžně a těší se velké oblibě.

Následuje stručný výčet odrůd, které jsou vybrány podle aktuální obchodní nabídky a informací nizozemské firmy Nursery De Smallekamp, která nabízí velké množství odrůd v České republice neznámých a nepěstovaných, a které navíc je ve svém katalogu stručně popisuje. Tato firma je jen jednou z mnoha Evropských firem, které nabízí potenciálně vhodné odrůdy pro naše klimatické podmínky a vypsané odrůdy jistě nejsou všechny, které mimo Českou republiku existují, následující tabulka uvádí příklady víceméně neznámých odrůd, které v našich podmínkách mají pěstební potenciál (Tab. 1) (DeSmallekamp.nl, 2018).

Tab. 1 - Seznam a stručná charakteristika méně známých odrůd, které by se mohly pěstovat v klimatických podmínkách na území České republiky. Zdroj informací o odrůdách pochází z (DeSmallekamp.nl, 2018).

Název odrůdy	Stručná charakterizace
Ampyon	Tato odrůda raší pozdně a je tedy odolná jarním mrazíkům. Je také odolná proti běžným chorobám.
Aufhasen Baden	Samosprašná odrůda původem z Německa s velkými plody.

Bolle Jan	Odrůda, která na jaře raší až velmi pozdě, takže mrazy jej neohroží. Bohužel má poněkud tvrdší skořápku a není samosprašný.
Broadview	Odrůda pocházející původně z Ukrajiny. Je menšího vzrůstu, takže je vhodná i do menších zahrad a odolává i mrazům, které dosahují až -30°C. Tato odrůda má apomixní semena a velký výnos už od velmi mladého věku.
Bucaneer	Pozdně rašící samosprašná odrůda, která je odolnější proti bakteriovým chorobám. Mrazy na jaře i v zimě jej neohroží. Udává se jako vhodná odrůda do studených oblastí.
Chandler	Chandler je moderní americká, částečně samosprašná odrůda. Vzhledem k tomu, že bohatě plodí i na laterálních výhonech, velmi dobře snáší řez, a to i strojový. Trvá cca 4–5 let než zaplodí. Podle USDA Hardiness Zones je Chandler vhodný do klimatické zóny 6–9, což je odolnost k teplotám až -31 °C, tedy vhodné pro pěstování ve většině oblastí České republiky.
Dionym	Částečně samosprašná odrůda s apomixními plody a s pozdním rašením, tedy odolná proti jarním mrazíkům. Plody také dozrávají poměrně brzo.
Hansen	Odrůda vyšlechtěná v Severní Americe. Roste pomalu a velikost dospělého stromu je také malá. Tento kultivar se vyznačuje velkým výnosem. Ořechy totiž rostou v trsech, které někdy čítají i třináct ořechů.

Kirchnuss	Česká odrůda, která raší pozdně a spolehlivě vydrží mrazy v naší přírodě. Je to odrůda samosprašná a zajímavá svými červenými plody.
Lake	Tento samosprašný kultivar má středně bujné koruny a velké plody. Udává se jako vhodný do chladnějších poloh.
No. 26 Kwanten	Samosprašná odrůda s pozdním rašením, které zajišťuje odolnost proti jarním mrazům.
Dwarf Karlík 3 a 5	Zajímavé odrůdy původem z Ukrajiny, jsou cizosprašné a ideálně jen mezi sebou. Jedná se o trpasličí odrůdy, které mají ve 20 letech výšku maximálně 2.3 metru a průměr koruny 1, 8 metru.
Mini Multiflora nr. 14	Další z trpasličích kultivarů, tentokrát samosprašný. Plodí již ve velmi mladém věku.
Wunder von Monrepos	Odrůda s apomixními plody. Jedná se o velký strom, který raší pozdně, vyhne se proto jarním mrazům a je odolný proti chorobám.

2.3.1 Zóny rostlinné odolnosti (USDA Hardiness Zones)

Které odrůdy lze pravděpodobně pěstovat na našem území ukazují mimo jiné i tzv. „zóny rostlinné odolnosti“, které vytvořil americký institut United States Department of Agriculture (USDA) v roce 2012 (USDA Plant Hardiness Zone Map, 2018).

Tyto zóny, určují zeměpisné regiony celého světa, které můžeme považovat za vhodné pro přirozený růst daného rostlinného druhu. Zóny jsou definovány vztahem klimatu v dané

oblasti a hranicemi teplotní odolnosti rostlin, tedy minimální a maximální teplotou, kterou je druh schopen přežít. Tyto zóny jsou určeny minimální teplotou naměřenou během několika zimních období (definované jako průměrná minimální roční teplota).

Znalost dané zóny odolnosti je výhodné vzhledem ke zjištění nejnižší zimní teploty - jednoho z hlavních faktorů ovlivňující přežití rostlin. Hodnoty zjištěné podle zónových map je ale třeba brát s mírnou rezervou, protože přežití daného rostlinného druhu nezávisí pouze na odolnosti k extrémní teplotě, ale i na odolnosti vůči teplu, půdní vlhkosti, srážkám, ozáření, délce mrazivého období, atd. Mapy odolnosti ukazují pouze odolnost rostlin vůči extrémním, nízkým teplotám a jsou zjednodušené (nezohledňují mikroklimatické rozdíly klimatických regionů) (USDA Plant Hardiness Zone Map, 2018).

Na základě těchto údajů můžeme předpovídat, které odrůdy ořešáků by se v našich podmínkách teoreticky daly pěstovat. Podle webové interaktivní mapy PlantMaps se Česká republika nachází v zónách s označením 7a až 8a (PlantMaps, 2018). Minimální průměrné teploty z tohoto regionu klesají až k teplotám $-17,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 3). Odrůdy, které jsou odolné těmto, nebo nižším teplotám mají potenciál v našich klimatických podmínkách úspěšně přežívat.



Obr. 3 - Zóny teplotní odolnosti rostlin v České republice podle (PlantMaps, 2018). Obrázek přejat a upraven z: <http://www.plantmaps.com/interactive-czech-republic-plant-hardiness-zone-map-celsius.php>

2.4 Rozmnožování Ořešáku královského

Ořešák královský (*Juglans regia*, L.) je, tak jako všechny druhy rodu *Juglans*, strom jednodomý s květy anemofilními (přenos pylu větrem) a jednopohlavními (Šobek, 1958). Květy rostou sice na jednom stromě, ale u ořešáku královského dochází k časově oddělenému vývoji samčích a samičích pohlavních orgánů. Samčí květenství tvoří svůj základ již v červnu až červenci z kuželovitých pupenů, které vyrostly v předešlém vegetačním období, a které vydrží až do jara následujícího roku, na rozdíl od samičích květů, které se vyvíjejí až na jaře z nově rostoucích letorostů (Jabůrek, 2008; Šobek, 1958).

Tyto kultivary jsou označovány jako cizosprašné, protože potřebují druhého jedince, který by je oplodnil. Této vlastnosti, kdy prašníky a blizny rostou, či dozrávají v různých časových obdobích, říkáme dichogamie. (Šobek, 1958) Jedná se o vlastnost, která v přírodě výrazně pomáhá tvorbě životaschopnějšího potomstva, usnadňuje křížení a zabraňuje dlouhodobé degeneraci při samosprašnosti.

U některých kultivarů může docházet k časovému překryvu v růstu samčích a samičích pohlavních orgánů. Takovéto kultivary potom mohou být částečně, či zcela samosprašné (Jabůrek, 2008).

Z hlediska komerční produkce pěstitele zajímá hlavně možnost množit ořešáky vegetativně, a tedy zachovat jejich odrůdovou stálost. Existují postupy, které jsou ověřené a používají se běžně, jako například nejběžnější roubování. Naopak existuje vegetativní množení, které je méně prozkoumané a má velký potenciál (mikropropagace). Nicméně vegetativní množení ořešáku je obecně náročné, ať už časově nebo finančně.

2.4.1 Apomixie

Stává se, že ořešáky vytvoří plody, aniž by jejich samičí květy byly opyleny vlastním nebo cizím pylem. Tento jev se nazývá „apomixie“. Jedná se o přirozeně se vyskytující jev, který je využíván při vegetativním množení některých kultivarů ořešáku královského (Cosmolescu, *et al.*, 2012). Některé vyšlechtěné kultivary se vyznačují poměrně velkým podílem apomixních

plodů a existují kultivary (některé z nich jsou zmíněny i v Tab. 1), které se komerčně prodávají a jsou žádané právě kvůli této vlastnosti. Například kultivar, který v Tab. 1 zmíněný není, Quinquan 1 se vyznačuje procentuálním poměrem až 48,53 % apomixních plodů (Guiliang, *et al.*, 2010). Apomixie se vyskytuje nejčastěji u kultivarů, které mají protandrické květenství, tedy u kultivarů, u kterých samčí jehnědy dozrávají dříve než samičí květy a v jejich okolí se nevyskytuje žádný jiný ořešák. Stává se to také u kultivarů, které nejsou dobře přizpůsobeny na jarním mrazíkům a jehnědy zmrznou. Plody vzniklé apomixií na rozdíl od parthenokarpie mají plně vyvinutá jádra, normálně klíčí a potomstvo z nich je bezchybným klonem mateřského stromu (Šobek, 1958).

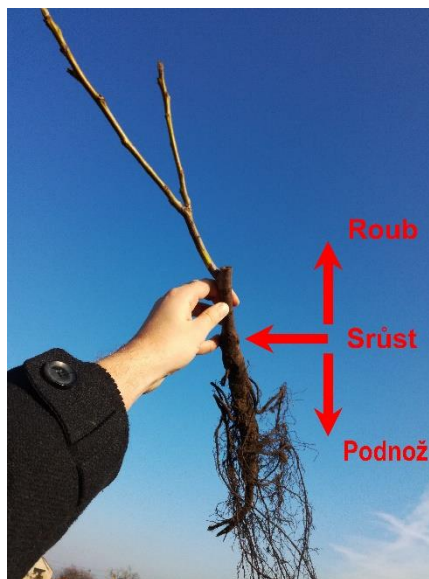
Plody vzniklé apomixií mohou být v některých případech i nedokonale vyvinuté a poměr apomixních plodů pravidelně kolísá. Mohou být menšího vzrůstu, či vyschlé. Nicméně apomixie vyskytující se u ořešáku královského budí zájem šlechtitelů a výzkumných pracovníků po celém světě, a to hlavně kvůli homozygotnosti vytvořených plodů, čehož se dá využít při zdokonalování vlastností šlechtěných kultivarů (Cosmolescu, *et al.*, 2012).

2.4.2 Roubování

Pokud není třeba zachovat odrůdovou stálost ořešáků, nejlepší možností je zasazení semena. Roubování je komerčně nepoužívanější metoda vegetativního rozmnožování ořešáku královského. Jedná se prozatím o jedinou možnost, jak složitě pěstovatelný ořešák rozmnožovat, při zachování odrůdy.

Roubování je metoda nepřímého rozmnožování, při němž přenášíme část ušlechtilé odrůdy (roub) na rostlinu druhou (podnož) (Obr. 4). Namnožená rostlina se v tomto případě skládá ze dvou, někdy i z více organismů. Jednotlivé část spolu srostou, vzájemně se ovlivňují a žijí v symbióze (Bílek, 1975). Podnož by měla z pěstitelského hlediska příznivě ovlivňovat růst a plodnost ovocného stromku. Podnož svými kořeny upevňuje stromek v zemi, přivádí do celého organismu živiny a ovlivňuje naroubovanou odrůdu k plodnosti, růstu a odolnosti proti chorobám. Vlastnosti podnoží jsou velmi důležité, a proto je výhodné i podnože produkovat klonováním (Kapitola 4.3).

Podle (Bílek, 1975) je postup roubování ořešáků následující. Jako podnož je použit semenáč ořešáku královského nebo ořešáku černého. Dvouletý semenáč je vykopán na podzim z půdy a vysázen do květináčů, kde zakoření a je připraven posloužit jako podnožový materiál. Jako rouby se používají jednoleté vrcholové výhony se dvěma pupeny, 12 až 15 cm dlouhé, které se sklízí také na podzim. Ořešák je roubován na kořenový krček podnože různými způsoby (klínek, sedélkování, kozí nožka, atd.). Roub je zavázán a zasazen do volné půdy po zimě, nejčastěji v květnu.



Obr. 4 - Morfologie čerstvě srostlé roubované rostliny ořešáku královského (maďarský kultivar Alsoszentivani).

Podle délky pěstování podnožového materiálu a délky kultivace čerstvého roubovance je patrné, že roubování je časově náročný a nákladný proces. U ořešáku však v této době nejpoužívanější, protože jiné druhy vegetativního rozmnožování nejsou dostatečně prozkoumané (mikropropagace), nebo nejsou pro vegetativní množení ořešáku vhodné (řízkování).

2.4.3 Řízkování

Vegetativní rozmnožování pomocí zakořeňování řízků je nejběžnější a nejjednodušší metoda množení rostlin. Jedná se o metodu, při níž se část rostlinného těla oddělí od matečné rostliny a nechá znovu zakořenit. Nicméně úspěšnost této metody a schopnost celkové regenerace kořenového systému se obrovsky liší druh od druhu. Stonky některých rostlin bez problému

koření v polních podmínkách, ale některé nevytvoří kořenový systém ani po speciální stimulaci (Gautam, 1989). Při pokusech o řízkování ořešáku bylo dosaženo velmi špatných výsledků (Gautam, 1989; Günes, 1999; Smyers, 1977).

Někteří autoři píšou o řízkování ořešáku jako o komerčně nevhodném, či dokonce nemožném (Rodriguez, *et al.*, 1989). Můžou za to špatné výsledky při iniciaci kořenění u stonků ořešáku. (Allemand, *et al.*, 1995) říká, že hlavním důvodem neschopnosti zakořenit, je rostlinný metabolit vyskytující se v ořešácích – juglon (5-hydroxy-1,4-naftochinon), jehož koncentrace ovlivňuje schopnost tvorby adventivních kořenů. Dalším možným důvodem může být zvýšený výskyt sklerenchymatických buněk, které obrůstají floém a inhibují tvorbu a prorůstání kořenů (Günes, 1999). Řízkování ořešáku královského je tedy velmi náročné a komerčně nepoužívané.

2.4.4 Rozmnožování *in vitro*

Mikropropagace, neboli rozmnožování *in vitro*, ořešáku královského má v budoucnu obrovský potenciál. Existují firmy, které již dosáhly úspěchu a produkce ořešáků pomocí mikropropagace je u nich běžnou praxí (Lopez, 2004). Takovéto firmy ovšem své vědecké postupy mnohdy zatajují, a proto poznatky o mikropropagaci ořešáku královského nejsou zdaleka kompletní (Kapitola 4).

3 Metoda práce – Mikropropagace

„Explantátové kultury“ jsou všeobecné označení pro všechny druhy rostlinných kultur kultivovaných *in vitro*. Jmenovitě se jedná o kultury kalusové, protoplastové, embryo, meristémové, orgánové, či prašníkové (Iliev, *et al.*, 2010). V dnešní době se explantátové kultury rostlin (mikropropagace, či *in vitro* sterilní kultury rostlin) staly nepostradatelnou součástí biologických oborů, zabývajících se studiem rostlin.

Využití mikropropagace můžeme nalézt v biochemii, fyziologii, morfologii i genetice rostlin. Její využití se neomezuje pouze na aplikovaný či základní výzkum, ale celá řada společností tuto metodiku považuje za nedílnou součást zemědělské produkce rostlin (Kováč, 1992). Stovky komerčních laboratoří po celém světě se nyní zabývají produkcí rostlin pomocí mikropropagace. Některé z nich produkují i více než 20 miliónů rostlin ročně (Kleyn, Kyte, 2013). Explantátové kultury vytvářejí cestu k pěstování a vegetativnímu rozmnožování rostlin, které se jinak pěstovat nedají, nebo jen s velkými obtížemi.

3.1 Metodika

Obecně se mikropropagací myslí vegetativní rozmnožování rostlin ve zkumavce. Kousek rostliny, který může být cokoliv od listu, stonku, pupenu až po jedinou buňku, se kultivuje ve sterilním prostředí, které neobsahuje žádné mikroorganismy a obsahuje médium složené z vyváženého poměru chemikálií, které rostlina potřebuje k přežití a ke zdárnému růstu (Kleyn, Kyte, 2013). V praxi to znamená oddělit ze sterilně vypěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla) (Kováč, 1992).

Regenerovat v dospělé rostlině se dá ze své podstaty každá izolovaná rostlinná část. Základem této rostlinné schopnosti je totipotence všech rostlinných buněk (Iliev, *et al.*, 2010). Každá rostlinná buňka je schopna dediferenciace a opětovného dělení a tvorby nových rostlinných orgánů. Proces dediferenciace je založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace, či inaktivace určitých genů příslušného

rostlinného druhu (Kováč, 1992). Teoreticky je tedy každé pletivo, obsahující buňky s funkčním jádrem, schopné posloužit jako explantát a v konečném důsledku zregenerovat celou funkční rostlinu.

3.2 Využití

Kultivace rostlin *in vitro* v kontrolovaném prostředí společně se znalostí složení kultivačního média, fyziologie rostliny a jejich přirozených potřeb, zaručuje velmi efektivní klonální propagaci geneticky stabilních jedinců (Iliev, *et al.*, 2010). Podle výše uvedených principů lze vyvodit možnosti využití této techniky. Mikropropagace se nepoužívá pouze ke komerčnímu vegetativnímu rozmnožování rostlin, ale využití je mnohem víc, a to jak v aplikovaném, tak v základním rostlinném výzkumu. Podle (Kováč, 1992) lze využití metodiky mikropropagace rozdělit takto:

1. Kultivace vegetačních vrcholů a pupenů, či indukce růstu adventivních pupenů na izolovaných rostlinných orgánech za účelem vegetativního rozmnožení dané matečné rostliny.
2. Kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravení rostlin od virových infekcí. Meristematická pletiva nejsou virovou infekcí zasažena a regenerovaná rostlina
3. Pomocí izolovaných embryí lze docílit překonání fyziologických bariér při hybridizaci taxonomicky vzdálených druhů.
4. Regulace procesu oplození a jeho ovlivňování *in vitro*.
5. Produkce haploidního potomstva při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíčků.
6. Spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin.
7. Řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů.
8. Inkorporace cizího genetického materiálu do buňky s cílem modifikace rostlinného genomu.

4 *In vitro* množení ořešáku královského

Mikropropagace ořešáku královského je extrémně složitá a celý proces provází mnoho problémů, které budou detailněji vysvětleny v následujících kapitolách, které popisují jednotlivé fáze mikropropagace z hlediska experimentů různých autorů. Úspěch dokonalé regenerace rostlin *in vitro* se nedostavuje převážně z důvodu odumírání explantátů kvůli časté vnitřní kontaminaci, vypouštění jedovatých exudátů do média a všeobecně z nedostatku odpovědi na prováděnou metodiku mikropropagace (Kleyn, Kyte, 2013).

Vědci se usilovně snaží o zavedení stabilní *in vitro* kultury ořešáku královského nejčastěji proto, aby se vyhnuli časově náročnému a výsledkově nestabilnímu roubování (Kleyn, Kyte, 2013).

4.1 Média a růst

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách je složení kultivačního média. Média používaná pro kultivaci izolovaných rostlinných částí obsahují běžně tyto komponenty: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo jiný zdroj organického dusíku, sacharidy, další nedefinované organické složky, zpevňující látku (agar) a růstové regulátory (Kováč, 1992).

Pro kultivaci explantátů z čeledi *Juglandaceae* bylo v průběhu let využito mnoho různých kultivačních médií v mnoha různých experimentech. Podle (Payghamzadeh, *et al.*, 2011) se využívala média: médium Driver a Kuniyuki (1984) – DKW (Tab. 3), médium Murashige a Skoog (1962) – MS (Tab. 2), „woody plant medium“ – WPM podle (Lloyd a McCown, 1980) a mnoho dalších. Tato média vykazovala velmi různorodé výsledky a úspěchy. Na základě těchto výzkumů bylo zjištěno, že nejvhodnější média pro kultivaci ořešáku královského, stejně jako pro kultivaci ostatních rostlin čeledi *Juglandaceae*, jsou média DKW a médium MS (Payghamzadeh, *et al.*, 2011) a v dnešní době jsou také nejběžněji využívána. DKW a MS média jsou totiž média, která obsahují vysoké koncentrace solí, což se ukázalo jako vhodné pro kultivaci ořešáku (Payghamzadeh, *et al.*, 2011). MS médium se vyznačuje vysokým obsahem dusíku. Oproti tomu například médium WPM obsahuje nízké

koncentrace solí a je také méně vhodné pro *in vitro* kultivaci ořešáku (Saadat a Hennerty, 2002) (Driver, Kuniyuki, 1984).

Tab. 2 - Jednotlivé komponenty základního složení MS média podle Murashige a Skoog (1962), které je vhodné pro *in vitro* kultivaci ořešáku královského.

Komponenty	MS (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .7H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .7H ₂ O	22.3
KI	0.83
Zn(SO ₄)	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
NaMoO ₄	0.25
CuSO ₄	0.025
CoCl ₂	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Sacharosa	30 g

Tab. 3 - Jednotlivé komponenty základního složení DKW média, obsahující vitamíny, podle (Driver a Kuniyuki, 1984), které je vhodné pro in vitro kultivaci ořešáku královského.

Komponenty	DKW (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1416
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1968
CaCl ₂ ·2H ₂ O	149
K ₂ SO ₄	1559
MgSO ₄ ·7H ₂ O	740
KH ₂ PO ₄	265
MnSO ₄ ·4H ₂ O	33.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	17
H ₃ BO ₃	4.8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	33.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	45.4
Myo-inositol	100
Thiamin-HCL	2
Kyselina nikotinová	1
Glycin	2
Sacharosa	30 g

4.2 Odvozování sterilní kultury

Sterilní *in vitro* explantátovou kulturu je třeba nejdříve odvodit přímo z tzv. matečné rostliny, která roste v aseptickém prostředí a je vystavena veškerým přírodním patogenům, vlivům vnějšího prostředí a u ořešáku s velkou pravděpodobností je i nakažena vnitřní bakteriální kontaminací. S odvozováním *in vitro* kultur s matečných rostlin ořešáků je spojováno velké množství náročných mezikroků. Je třeba hlavně desinfikovat explantát a zbavit jej vnitřních kontaminací. Vzorky, které se odebírají z matečných rostlin mohou být různého charakteru. Odebírají se například embrya nebo jednotlivé nodální segmenty (Revilla, *et al.*, 1989), či boční nebo apikální pupeny (Preece, *et al.*, 1989).

4.2.1 Průběh odvozování sterilní kultury ořešáku královského

Základním a většinou prvním krokem po odebrání vzorku z matečné rostliny, je povrchová sterilizace celého vzorku. Různé zdroje udávají různé protokoly pro vnější desinfekci explantátů. Například (Al-Mizory, Azad, 2012) udává při vnější sterilizaci následující postup: explantátem byly juvenilní prýty, cca pěti nodální segmenty o délce průměrně 10 cm. Tyto explantáty byly ponořeny na 30 s do 70% ethanolu a následně ponořeny na 10 minut do desinfekčního roztoku obsahujícího 0,05% roztok HgCl₂. Tyto explantáty byly poté 3x promyty v destilované vodě a následně nasazeny na kultivační médium. Další možný desinfekční protokol uvádí například (Leal, *et al.*, 2007). Tito autoři prováděli desinfekci zdřevnatělých větví, asi 20 cm dlouhých, z dvou až čtyř letých stromů rostoucích v polních podmínkách. Vnější desinfekce byla provedena v laminárním boxu, a to nejdříve mixem fungicidů (Captan + Benomyl, oba o koncentraci 1 g/l⁻¹) za neustálého míchání po dobu 20 minut. Větve byly 3x promyty ve sterilní vodě a na filtračním papíře zanechány k úplnému povrchovému vysušení. Poté byly větve přeneseny do 200 ml lahví a ponechány ve sterilních podmínkách, dokud nezačaly rašit pupeny. Tyto rašící pupeny už byly sterilní, a proto práce s nimi nevyžadovala další povrchovou sterilizaci.

(Bourrain, 2009) použila ve svém experimentu následující sterilizační postup: použity byly mladé, polodřevnaté, cca 10 cm dlouhé, několika nodální segmenty. Ty byly v laminárním

boxu promyty v roztoku Mecryl (kombinace chemikálií chlorhexidine gluconate a benzalkonium chloride), následně promyty v 70% alkoholu (ethanol, isopropanol) a po dobu 20 minut byly promyty v 1–2% roztoku chlornanu vápenatého (SAVO). Na závěr byly explantáty promyty 3x v destilované vodě.

Jak je z uvedených postupů zřejmé, protokolů pro povrchovou desinfekci je mnoho, jsou velmi různorodé a liší se od autora k autorovi. Ve své podstatě se ale opakují stále ty samé principy, a to je promytí ve sterilní vodě a v roztoku alkoholu. V mnoha případech jsou také použity některé komerčně prodávané fungicidy. Podle Khoshkhoye (2005) výrazně zvyšuje úspěšnost povrchové sterilizace, pokud explantáty ihned po odběru z matečné rostliny necháme promývat v tekoucí vodě po dobu od 30 minut po 2 hodiny. Tento autor také uvádí, že promývání vodou s mýdlem je efektivnější než promývání pouze čistou vodou.

4.2.2 Problémy při odvozování sterilní kultury ořešáku královského

Mezi hlavní problémy při odvozování sterilní kultury ořešáků je fenomén hnědnutí média, které je způsobené chemikáliemi, které ořešák v přírodě používá pro alelopatické interakce s okolními rostlinnými organismy (např. známá látka juglon – 5-hydroxy-1,4-naftalendion). Hnědnutí je výsledek oxidace polyfenolických látek, které explantáty vypouštějí do okolního média (Payghamzadeh, *et al.*, 2011). Tyto chemikálie v médiu způsobují kromě hnědého zbarvení také inhibici buněčného růstu explantátu, který na médiu roste (Tarinejad, 2013).

Eliminace, či inaktivace těchto chemikálií je jakési překročení největší bariéry, která existuje pro mikropropagaci ořešáku *in vitro*. Běžná metoda pro eliminaci této bariéry je přepasážování explantátů na čisté médium ve velmi krátkých intervalech, například v intervalech 1 – 2 dnů po dobu 5 dní (Long, *et al.*, 1995). Další možností je podle (Curir, *et al.*, 1985) kultivace explantátu na médiu obsahujícím aktivní uhlí po dobu 3 dnů s následným přenesením na čisté médium. Tato metoda se ukázala jako vysoce účinná a explantáty vykazovaly vyšší životnost.

Jedním z dalších hlavních problémů ořešákových explantátů jsou jejich vnitřní bakteriální kontaminace (Obr. 5). Aby byly eliminovány, nejčastěji se používají různé

antibiotické přípravky, které jsou přidávány přímo do média, jako to například bylo provedeno v experimentu (Revilla, *et al.*, 1989), kde bylo testováno a do jednoho média přidáno několik různých antibiotických přípravků. Tato směs byla označena jako „mix A“ a obsahovala: cefotaxim 25-75 mg/l⁻¹, tetracycline 25 mg/l⁻¹, rifampicin 6 mg/l⁻¹, streptomycin 1-2 mg/l⁻¹, ampicillin 25 mg/l⁻¹. Tento mix umožnil 50 % explantátů dokonalou regeneraci, a tedy úplné zbavení vnitřní kontaminace. Bylo také zjištěno, že vyšší koncentrace cefotaximu způsobuje nekrózy a smrt explantátů.

Jedním z používaných a komerčně vyráběných prostředků na řešení kontaminací u explantátových kultur je PPMTM – Plant Preservation Mixture. Jedná se o antibiotikum, které působí širokospektrálně a na více druhů kontaminací. Zabíjí bakterie i houby, zabraňuje klíčení spor a ve vyšších koncentracích dokáže i vyléčit vnitřní kontaminace u explantátových kultur. Podle oficiálních informací firmy Plant Cell Technology, je použití pro vyléčení vnitřních kontaminací explantátu ořešáku královského potřebná koncentrace 2 ml/l⁻¹ Obrovskou výhodou tohoto produktu je jeho vysoká tepelná stabilita, lze jej tedy přidat do média ještě před autoklávováním, aniž by přišel o své účinky (Plantcelltechnology, 2018).



Obr. 5 - Viditelná vnitřní kontaminace v podobě bakteriální kultury, rozšířené do kultivačního média u explantátu ořešáku královského, odvozeného z nesterilních přírodních podmínek a kultivovaného experimentálně na médiu J4. Tento explantát byl nakonec vlastní kontaminací zahuben v časovém intervalu několika dní.

4.3 Tvorba kořenového systému

Pro metodu *in vitro* mikropropagace kterékoli rostliny je indukce tvorby kořenového systému důležitý krok předcházející úspěšnému vývoji rostliny v půdě, a tedy v již nesterilních podmínkách. Zakořeňování rostlin je jednou z nejobtížnějších etap mikropropagace většiny rostlinných druhů, ale u některých druhů je zakořeňování *in vitro* jedinou úspěšnou metodou zakořeňování *in vitro* odvozených prýtů (Kováč, 1992). Tvorba kořenového systému je u explantátových kultur ořešáku nesmírně složitý proces.

Se zakořeňováním rostlin ořešáků rozmnožených *in vitro* se začalo aktivně experimentovat od roku 1984, kdy bylo představeno Driver Kuniyuki Walnut (DKW) médium speciálně vytvořené pro rozmnožování ořešáků (Driver a Kuniyuki, 1984). Driver a Kuniyuki (1984) popsali metodu *ex vitro* zakořeňování explantátu u kultivaru „Paradox“, založenou na namočení explantátů v 0,5 mM roztoku IBA. Následovalo prosté přenesení do substrátu obsahující směs písek:rašelina:perlit.

V roce 1987 publikovali Driver a Suttle (1987) metodu přímého zakořeňování v půdě u předem vypěstovaných rostlin *in vitro*, které rostly na modifikovaném DKW médiu (McGrahaman, *et al.*, 1987) v podmínkách sníženého osvětlení a nižší teploty. Explantáty byly poté omyty v roztoku systematických fungicidů a bazální konce namočeny do zakořeňovacího prášku obsahujícího 2 g IBA ve 100 g mastku. Takto ošetřené rostliny byly poté umístěny přímo do substrátu a venkovního nesterilního prostředí. Byly pouze přikryty plastovými kelímky, či polystyrenem pro udržení vyšší vzdušné vlhkosti a zároveň k redukci slunečního záření dopadajícího na rostliny, a tedy ke snížení tepla v okolí rostliny. Tyto metody byly sice úspěšné a k vytvoření kořenového systému došlo, jedná se ale o úspěšnost spíše experimentální a z komerčního hlediska jsou téměř nevyužitelné, jelikož míra úspěšnosti nebyla dostatečná.

Jay-Allemand *et al.* (1992) vymyslel a jako první použil metodu dvoufázového zakořeňování *in vitro*. Zároveň také přidal do média vermikulit, aby tak zvýšil provzdušnění média při druhé (expresní) fázi tvorby kořenového systému. Tento pokrok usnadnil a zefektivnil zakořeňování explantátů, díky zvýšení počtu kořenicích rostlin *in vitro*. Rostliny zároveň, díky stejným kultivačním podmínkám, tvořily velmi podobné kořenové systémy, což usnadnilo jejich následnou aklimatizaci na nesterilní venkovní prostředí. V první fázi, a tedy indukci zakořeňování, Allemand (1992) použil DKW médium o čtvrtedí síle s přidavkem

24.6 μM IBA. Explantáty přepasážívané na toto médium kultivoval ve tmě po dobu 6 dnů při teplotách 24 ± 1 °C po dobu 16 hodin a 21 ± 1 °C po zbývajících 8 hodin. Ve druhé fázi auxinem ošetřené explantáty přepasážíval na $\frac{1}{4}$ DKW médium, které neobsahovalo žádné hormonální regulátory růstu, ale obsahovalo navíc vermikulit (Fertil-Vermagri, Size M, France) v poměru 1:1,25. Přidání vermikulitu vedlo k navýšení schopnosti tvořit kořenový systém *in vitro* (Allemand, *et al.*, 1992)

Tohoto dvoufázové zakořeňování nyní využívá převážná většina vědců, pokoušející se zakořenit explantáty ořešáku královského *in vitro*. Například v roce 2001 této dvoufázové metody využili Navatel a Bourrain (2001), kteří metodu modifikovali a poprvé ji zkusili na třech silných komerčně žádaných kultivarech *J. regia* („Lara“, „Chandler“ a „Franquette“). Zjistili, že různé kultivary se navzájem velmi liší ve schopnosti vytvořit kořenový systém *in vitro*. Také Sadaat a Hennerty (1999) zkoumali tuto dvoufázovou metodu, a to s použitím několika modifikací. Nejvíce se jim osvědčilo zakořeňovat explantáty kultivací na $\frac{1}{2}$ DKW médiu doplněno o 20 μM IBA ve tmě po dobu 9 dnů, které poté přímo zasadili do papírových květináčů Jiffy-7®.

Dvoufázové zakořeňování se stalo nepoužívanější metodou zakořeňování *in vitro*. Mnoho autorů popsanou metodu používá s různými modifikacemi pro jednotlivé kultivary ořešáků se snahou optimalizovat podmínky experimentu pro co nejlepší výsledky. (Vahdati, *et al.*, 2004) použili tuto metodu pro tři kultivary („Sunland“, „Chandler“ a „Vina“). Tyto tři kultivary rostly na kultivačním médiu obsahující základní médium DKW s přídavkem $2,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ fytagelu (sigma chemicals Co., St. Louis), $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosy, $4,4 \mu\text{M}$ BA a $0,05 \mu\text{M}$ IBA. Médium upravili na pH 5.5 a to před přidáním fytagelu a autoklávováním. Explantáty byly kultivovány v pokojové teplotě ($25 - 30$ °C) při 16-hodinové fotoperiodě o osvětlení $40-60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V první fázi indukce tvorby kořenového systému byly explantáty seřezány na bazálním konci a zbaveny veškerého kalusu a následně přepasážívány na indukční médium. Poté byly umístěny do tmy na sedm dní do teploty 22 °C. Indukční médium bylo složeno z MS média o 100 % obsahu solí a vitamínů s přídavkem $15 \mu\text{M}$ IBA, $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sacharosy a $9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ agaru Kobe (Serva Co.). Záměnu MS za DKW provedli na základě výsledku Navatele a Bourrain (2001). Médium bylo upraveno na pH 5.5 před přidáním agaru a autoklávováním.

Ve druhé fázi (expresní) byly explantáty přeneseny na médium podporující tvorbu kořenového systému. Toto médium bylo složeno z mixu 1:1,25 (v/v) DKW médium o čtvrtinové

síle s vermikulitem. Složení takového média bylo dosaženo smícháním 100 ml DKW média o čtvrtinové síle obsahující 2,4 g.L⁻¹ fytagelu a 30 g.L⁻¹ sacharosy a 125 ml vermikulitu. Médium bylo autoklávováno a do každé sklenice bylo přepasážováno osm explantátů. Tvorba kořenového systému na tomto médiu trvala 28 dní.

Takto kultivovány byly explantáty všech tří kultivarů a výsledky experimentu byly u každého z nich procentuálně odlišné. Nejlepších výsledků dosáhnul kultivar „Sunland“, jehož úspěšnost tvorby kořenů byla 94 % (88 vzorků). Úspěšnost vytvoření kořenů *in vitro* u kultivaru „Chandler“ byla 55 % (76 vzorků) a nejhorsí výsledky byly pozorovány u těžce kořenícího kultivaru „Vina“ (67 vzorků), u kterého byl kořenový systém vytvořen pouze u 27 % všech explantátů. Výsledky jejich experimentu také ukázaly, že pro indukci tvorby kořenů je optimální teplota 22 °C a kultivace ve tmě na indukčním médiu po dobu 6 dnů. Navatel a Burrain (2001) dosáhli nejlepších výsledků při kultivaci na indukčním médiu ve tmě po dobu 8 dní.



Obr. 6 - Výsledek v experimentu zakořeňování explantátů ořešáku a výsledné kořenové systémy podle (Vadhati, et al., 2004).

Výsledky experimentu Vadhatiho, *et al.* (2004) (Obr. 6) také ukázaly, že nejlepší výsledky při výsledném zakořeňování má médium s koncentrací sacharó 40 – 60 g.L⁻¹ (až 62 % zakořeněných explantátů) a naopak média s koncentracemi sacharosy 10 či 20 g.L⁻¹ měly procentuální úspěšnost zakořeňování 0 – 3 %. Koncentrace sacharosy neměla vliv na kvalitu a velikost vytvořených kořenů.

5 Význam množení Ořešáku královského *in vitro*

Aplikace metodiky *in vitro* mikropropagace ořešáku královského je významná z mnoha důvodů. Nejdůležitější je zvládnutí jedné z technik vegetativního rozmnožování ořešáků, při souběžném omezení vysokých nákladů spojených se standardním roubováním. Ořešáky rozmnožené *in vitro* zaručují dokonalou odrůdovou stálost, protože se jedná o vegetativní množení (Payghamzadeh, *et al.*, 2011).

Pravokořenné odrůdy

Ořešáky vypěstované *in vitro* mají vyvinutý vlastní kořenový systém, což ze znalosti fyziologie rostlin musí být pro rostlinu přínosné. Rostliny množené roubováním jsou vlastně srostlé dvě různé rostliny a jejich funkce je proto v některých směrech omezena. Také z hlediska nábytkářského průmyslu (kapitola 2.2) je tvorba pravokořenných rostlin vhodná. Dřevo je vyšší kvality a na pravokořenném stromě lze nalézt zcela nepoškozenou kořenicí (vysoce ceněné dřevo z oblasti kořenového krčku stromu). Teoreticky se mohou šlechtit kultivary určené přímo na produkci dřeva o vysoké nábytkářské kvalitě.

Výsledky výzkumu firmy Vitrotech Biotechnologia Vegetal (Lopez, 2004) ukazují, že produkce ořechů na pravokořenných stromech je v mnoha případech vyšší než produkce ořechů na rostlinách stejného kultivaru, které jsou ale množené pomocí roubování. Zároveň poukazují na skutečnost, že pravokořenné stromy vykazují vitálnější růst. (Hasey, *et al.*, 1999) zjistili, že kultivar Chandler, rostoucí jako pravokořenný, vykazuje mnohem větší vitalitu a větší míru růstu než kultivar Chandler rostoucí na podnoži komerčně množené – podnož kultivaru Paradox (viz podnožový materiál). V tomto případě byl dokonce po 5 letech změřený výnos třikrát vyšší u pravokořenného Chandleru, než u Chandleru roubovaného.

(Lopez, 2004) zjistil, že pravokořenné ořešáky rostou s vysokou vitalitou i v podmínkách, které se velmi vzdalují od ideálních pro ořešák královský.



Obr. 7 - Kořenový systém tříletého pravokořenného ořešáku královského kultivar Vina (Lopez, 2004)

Podnožový materiál

Pro roubování se běžně jako podnože používají obyčejné jednoleté semenáčky ořešáku královského. Při tomto způsobu produkce podnoží však existuje možný problém a tím je různorodost genotypu podnožového materiálu. Každá podnož určuje vlastnosti dospělého stromu, a proto je žádoucí produkovat podnožový materiál, který má stabilní genotyp, specifické vlastnosti nebo tyto vlastnosti předává roubu, a tak i dospělému stromu (Lopez, 2004) (DeBuse, *et al.*, 2010).

Známým podnožovým materiálem pro vlašské ořechy množným pomocí mikropropagace je kultivar Paradox. Tento kultivar se běžně používá jako podnož při roubování například v Kalifornii (DeBuse, *et al.*, 2010). Jedná se o genotyp, který svému roubu udává vlastnosti jako jsou vysoká vitalita, lepší adaptabilita na různé podmínky pěstování a lepší toleranci k půdnímu kmenu parazitů *Phytophthora*, který způsobuje kořenovou hnilobu (DeBuse, *et al.*, 2010).

Nedávné studie vedly ke komerční dostupnosti třech nových kultivarů, které jsou pěstovány pomocí mikropropagace. Těmi jsou: RX1, VX211 a Vlach, které taktéž svým roubům

předávají kvalitní vlastnosti a zvýšení rezistence proti chorobám a škůdcům (DeBuse, *et al.*, 2010).

Ozdravení od virů a onemocnění

Jelikož většina ořešáků obsahuje vnitřní bakteriální kontaminace (kapitola 4.2.2.), je vhodné použití mikropropagace jako způsob jejich léčení. Metoda mikropropagace produkuje rostliny, které jsou bez jakýchkoliv vnitřních kontaminací, ať už virových nebo bakteriálních, pokud se jedná o meristemickou kulturu (Bhatia, *et al.*, 2015). Pokud odvodíme stabilní a zdravou *in vitro* explantátovou kulturu a dále ji množíme, pak produkuje potomstvo, které je prosté jakýchkoliv virových či bakteriálních kontaminací.

6 Postup experimentu

6.1 Seznam použitých pomůcek a chemikálií

Pomůcky použité při přípravě médií a při práci s explantáty:

- váhy (mg), mikrovlnná trouba, míchačka na média, pH metr, autokláv, laboratorní sklo a pomůcky, sterilní laminární box a pomůcky potřebné k práci v tomto boxu.

Chemikálie použity pro přípravu médií:

- demineralizovaná H₂O, DKW basal mixture (D0246.0025 Duchefa), myo-inositol, thiamin HCl, kyselina nikotinová, glycin, BA, mT, IBA, glukosa, sacharosa, agar S1000

Chemikálie použité pro sterilizaci explantátů:

- sterilní H₂O, 0,1 % HgCl₂, isopropanol, 70% ethanol

6.2 Fáze I – Odvození sterilní explantátové kultury z matečné rostliny

Experiment odvozování sterilní explantátové kultury byl proveden dvakrát v letech 2017 a 2018, a to vždy na jaře, kdy matečné rostliny ořešáku královského ukončily svou zimní dormanci a pupeny začaly rašit. Experimenty byly provedeny na základě získaných informací při zpracovávání teoretické části diplomové práce (Kapitola 4.2).

Nejdříve byl proveden zkušební experiment, aby bylo možné porovnat vhodnost použití speciálně navrženého média J5. V tomto experimentu bylo cca 30 vícenodálních juvenilních prýtů kultivarů Mars o délce 2-5 cm povrchově vysterilizováno a přeneseno na médium J4.

Další explantáty přenesené z aseptických podmínek mateřských rostlin byly nejdříve povrchově vysterilizovány a poté přeneseny na kultivační médium s označením J5 (Tab. 4) obsahující mimo jiné i 2 ml/l PPMTM (Biotech.cz 2017) a 2 g/l aktivního uhlí. Médium J5 bylo

připraveno na základě nastudování teoretických informací o problémech týkajících se odvozování sterilní kultury (hnědnutí média, vnitřní kontaminace).

Tab. 4 - Složení kultivačního média J5. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
DKW basal salt mixture: D0246.0025 Duchefa	5,4795 g
Inositol	100 mg
Thiamin HCl	2,0 mg
Nicotinic acid	1,0 mg
Glycin	2 mg
mT	2 mg
IBA	0,01 mg
Aktivní uhlí	2 g
PPM™	2 ml
Glukosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Odvozování sterilní kultury v roce 2017.

Pro odvozování sterilní kultury v roce 2017 byly vybrány kultivary Mars, Jupiter, Seifersdorfský o celkovém počtu 150 explantátů. Po ukončení dormance a po začátku klíčení jednotlivých kultivarů byly odebrány několikanodální juvenilní prýty o délce cca 5–10 cm (Obr. 8). Explantáty byly nejdříve ponechány k proplachu v tekoucí vodě po dobu 60 minut. Explantáty byly dále sterilizovány nejdříve 3 minuty v 0,1 % HgCl₂ a poté jednou promyty ve sterilní vodě. Takto vysterilizované explantáty byly přeneseny na médium J5 a ponechány ke kultivaci

v podmínkách: 16 h den (24 °C), 8 h noc (21 °C); osvětlení zářivky značky Philips TLD 58W/840 - cool white, ve vzdálenosti 30 cm od rostlin produkují ozáření 50 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$. Tyto explantáty byly přepasážovány na čerstvé médium vždy v intervalu vždy po jednom týdnu kultivace.



Obr. 8 - Vícenodální segmenty ořešáku královského kultivaru Seifersdorfský, kultivované na médiu J5 v roce 2017.

Odvozování sterilní kultury v roce 2018.

Pro odvozování sterilní kultury v roce 2018 byly vybrány kultivary Mars, Jupiter a Chandler o celkovém počtu 100 kusů explantátů.

Způsob odebrání explantátů: Po ukončení dormance a po začátku klíčení jednotlivých kultivarů byly odebrány nové juvenilní prýty o délce cca 5–10 cm, které byly nařezány na jednonodální segmenty (Obr. 9). Explantáty byly nejdříve ponechány k proplachu v tekoucí vodě po dobu 60 minut. Explantáty byly dále sterilizovány nejdříve 3 minuty v 0,1% HgCl_2 a poté jednou promyty ve sterilní vodě.



Obr. 9 - Segmenty ořešáku královského použity pro odvozování sterilní kultury in vitro v roce 2018.

Vysterilizované explantáty byly přeneseny jednotlivě do sterilních zkumavek obsahujících cca 5 ml odvozovacího média J5 (Obr. 10) a kultivovány v podmínkách: 16 h den (24 °C), 8 h noc (21 °C); osvětlení zářivky značky Philips TLD 58W/840 - cool white, ve vzdálenosti 30 cm od rostlin produkují ozáření 50 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$. Tyto explantáty byly přepasážovány vždy na čerstvé médium v intervalu 2 až 5 dnů.



Obr. 10 - Jednodální segmenty kultivaru Mars kultivované na médiu J5 v uzavíratelných plastových zkumavkách.

6.3 Fáze II – Optimalizace kultivačních podmínek pro množení ořešáku královského pomocí mikropropagace

Pro fázi optimalizace kultivačních podmínek při množení ořešáku královského pomocí mikropropagace byla použita již stabilní *in vitro* kultura poskytnutá firmou Jan Holub s.r.o.. Tato kultura byla odvozena z více čerstvě klíčících semen ořešáku královského. *In vitro* kultury použity pro tuto fázi jsou tedy *in vitro* pěstované semenáče s pracovním označením S1-S7. Pro tyto explantáty, které již nevypouštějí polyfenolické látky do média a zároveň nejsou kontaminované vnitřními kontaminacemi bylo navrženo médium J2 (Bourrain, 2009) (Tab. 5), které obsahuje modifikaci v hormonálním složení. Byl použit místo látky BA (benzylaminopurin) jiný hormon mT (meta-Topolin) (Moyo, *et al.*, 2018), dále bylo navrženo další modifikované médium J4 (Tab. 6).

Médium J4 bylo navrženo na základě nastudovaných informací v teoretické části diplomové práce (Kapitola 4.1). Také na základě vlastních poznatků o růstu explantátů na médiu J2 bylo navrženo modifikované médium J4, které obsahuje jiný poměr hormonů.

Tab. 5 - Složení modifikovaného kultivačního média J2 (Bourrain, 2009). Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
DKW basal salt mixture: D0246.0025 Duchefa	5,4795 g
Inositol	100 mg
Thiamin HCl	2,0 mg
Nicotinic acid	1,0 mg
Glycin	2 mg
BA	0,5 mg
mT	2 mg
IBA	0,01 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Glukosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Tab. 6 - Složení kultivačního média J4. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
DKW basal salt mixture: D0246.0025 Duchefa	5,4795 g
Inositol	100 mg
Thiamin HCl	2,0 mg
Nicotinic acid	1,0 mg
Glycin	2 mg
mT	2 mg
IBA	0,01 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Glukosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Explantáty na těchto médiích jsou kultivovány v SD sklenicích, které obsahují cca 50 ml kultivačního média.

Podmínky v kultivační místnosti: 16 h den (24 °C), 8 h noc (21 °C); osvětlení zářivky značky Philips TLD 58W/840 - cool white, ve výšce 30 cm od rostlin produkují ozáření 50 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$.

6.4 Fáze III – Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách

Experiment č. 1

První experiment byl proveden po úspěšném zavedení sterilní kultury na médiu J4, na kterém explantáty rostly do takové míry, že bylo možné použít je na dvoufázové kořenění podle (Bourrain, 2009). Celkově bylo pro tento experiment použito 15 explantátů s variabilní délkou mezi 1,5 až 4 cm délky kultivaru S4.

Byly použity dvě kultivační média pro fázi indukce a pro fázi exprese kořenění explantátu ořešáku královského kultivaru S4 s pracovním označením Jin.1 a Jex.1 (Tab. 8, Tab. 9).

Jin.1 – „Indukční no. 1“ (Bourrain, 2009)

Tab. 7- Složení indukčního média Jin.1. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
MS zásobní roztok	100 ml
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Vitamíny MS	5 ml
Glycin	2 mg
IBA	2 mg
Sacharosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Jex.1 – „Expresní no.1“ (Bourrain, 2009)

Tab. 8 - Složení expresního média Jex.1. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média. Po autoklávování média bylo médium smícháno s vermikulitem v poměru 1:1.25.

Látka	Hmotnost/Objem
MS zásobní roztok ¼	25 ml
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Vitamíny MS	5 ml
Glycin	2 mg
Glukosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Kultivační podmínky: Doba kultivace byla u tohoto experimentu celkem 5 týdnů.

Nejdříve byly explantáty kultivovány jeden týden na indukčních médiu ve tmě po dobu jednoho týdne při střídajících se teplotách 24 °C po dobu 16 h a 21 °C po dobu 8 h.

Další 4 týdny po kultivaci na indukčních médiích byly explantáty přeneseny na média expresní do následujících kultivačních podmínek: 16 h den (24 °C), 8 h noc (21 °C); osvětlení zářivky značky Philips TLD 58W/840 - cool white, ve výšce 30 cm od rostlin produkují ozáření 50 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$.

Experiment č. 2

Na základě výsledků z prvního experimentu, a hlavně na základě nastudování další teorie o iniciaci kořenění explantátů ořešáku královského (Kapitola 4.3), bylo pro druhý experiment navrženo více typů indukčních a expresních médií (Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14),

kteře byly pouřity pro nejlépe rostoucí explantáty semenáče s označením S4. Explantáty byly vybrány o různých délkách, aby bylo možné sledovat efekt délky stonku na schopnosti zakořenit. Pro každou kombinaci médií byly pouřity pouze 4 explantáty z důvodu nedostatku materiálu vhodného pro experimenty tvorby kořenového systému.

Média byla testována při dvoufázovém kořenění explantátů ve všech možných kombinacích, a to konkrétně: Jin.1 + Jex.1, Jin.1 + Jex.2, Jin.2 + Jex.1, Jin.2 + Jex.2, Jin.3 + Jex.1, Jin.3 + Jex.2.

Kultivační podmínky: Doba kultivace byla celkově u tohoto experimentu 8 týdnů.

Nejdříve byly explantáty kultivovány jeden týden na indukčních médiích ve tmě po dobu jednoho týdne při střídajících se teplotách 24 °C po dobu 16 h a 21 °C po dobu 8 h.

Dalších 7 týdnů po kultivaci na indukčních médiích byly explantáty přeneseny na média expresní do následujících kultivačních podmínek: 16 h den (24 °C), 8 h noc (21 °C); osvětlení zářivky značky Philips TLD 58W/840 - cool white, ve vzdálenosti 30 cm od rostlin produkují ozáření 50 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}^2$.

Použitá média:

Jin.1 – „Indukční no. 1“ (Bourrain, 2009)

Tab. 9 - Složení indukčního média Jin.1. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
MS zásobní roztok	100 ml
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Vitamíny MS	5 ml
Glycin	2 mg
IBA	2 mg
Sacharosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Jin.2 – „Indukční no.2“ (Vahdati, et al., 2004)

Tab. 10 - Složení indukčního média Jin.2. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
MS zásobní roztok	100 ml
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Vitamíny MS	5 ml
Glycin	2 mg
IBA	3 mg
Sacharosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	5.5

Jin.3 – „Indukční no.3“ (Allemand, *et al.*, 1992)

Tab. 11 - Složení indukčního média Jin.3. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média.

Látka	Hmotnost/Objem
¼ DKW (D0246.0025 Duchefa)	1.369 g
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Glycin	2 mg
Thiamin-HCL	2 mg
Kyselina nikotinová	1 mg
IBA	5 mg
Sacharosa	40 g
Agar (S1000)	8,5 g
pH	5.5

Jex.1 – „Expresní no.1“ (Bourrain, 2009)

Tab. 12 - Složení expresního média Jex.1. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média. Před autoklávováním média bylo médium smícháno s vermikulitem v poměru 1:1.25.

Látka	Hmotnost/Objem
MS zásobní roztok ¼	25 ml
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Vitamíny MS	5 ml
Glycin	2 mg
Glukosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Jex.2 – „Expresní no.2“ (Vahdati, *et al.*, 2004; Allemand, *et al.*, 1992)

Tab. 13 - Složení expresního média Jex.2. Použité látky byly míchány do výsledného objemu 1 l média. Před autoklávováním média bylo médium smícháno s vermikulitem v poměru 1:1.25.

Látka	Hmotnost/Objem
¼ DKW (D0246.0025 Duchefa)	1,369 g
Inositol	100 mg
Fe-EDDHA	100 mg
Glycin	2 mg
Thiamin-HCL	2 mg
Kyselina nikotinová	1 mg
Sacharosa	30 g
Agar S1000	8,5 g
pH	6

Po vyhodnocení tvorby kořenového systému byly všechny explantáty vyjmuty ze sterilních podmínek a zasazeny do rašeliny. Každý explantát, u kterého nebyla pozorována žádná tvorba kořenového systému byl dodatečně ošetřen 0,5% IBA v talku. Všechny explantáty (s vytvořeným kořenovým systémem i ty bez něj, ošetřené 0,5% IBA v talku) byly zasazeny do substrátu v PE nádobě a překryty pórovitou fólií (Obr. 11), aby byla zajištěna vyšší vzdušná vlhkost.



Obr. 11 - Rostlinky ořešáku královského převedené ze sterilních podmínek in vitro do podmínek nesterilních a kultivované po dobu jednoho měsíce v zahradnickém substrátu v průhledné PE nádobě překryté pórovitou fólií k zajištění vyšší vzdušné vlhkosti.

Po měsíci kultivace v nesterilních podmínkách byly rostlinky z PE nádoby vyjmuty a byla zkontrolována tvorba kořenového systému u rostlin dodatečně ošetřených práškovou IBA a zároveň byl zkontrolován vývoj kořenového systému vytvořeného již na expresním médiu. Rostlinky s vytvořeným kořenovým systémem byly zasazeny do květináčů o průměru 9 cm do rašelinového substrátu.

7 Výsledky

7.1 Fáze I – Odvození sterilní explantátové kultury z matečné rostliny

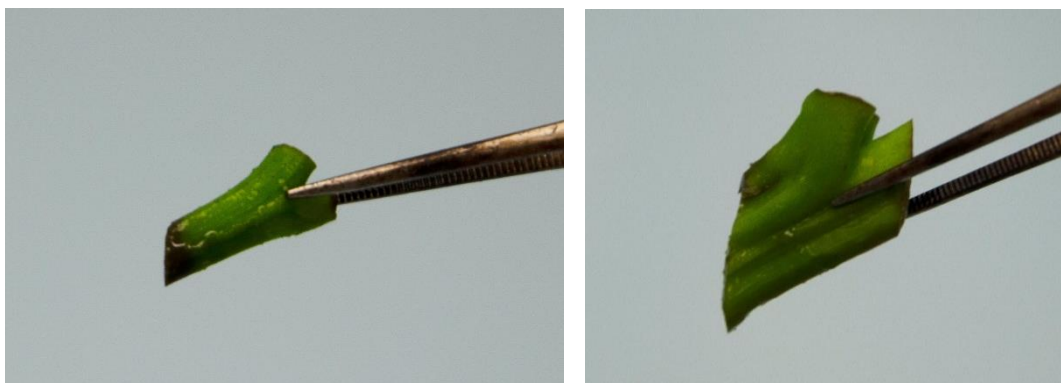
Odvozování sterilní kultury v roce 2017

Výsledkem zkušebního experiment, který byl proveden na médiu J4, byl úhyn 100 % explantátů. Všechny kultivované explantáty se projeví viditelnou vnitřní kontaminací, která je v řádu několika dní zcela zahubila (Obr. 5).

Vícenodální prýty v dalším experimentu na médiu J5 byly přepasážovány každých 7 dní po dobu 5 týdnů. Z původních 150 odvozených explantátů (50 ks Mars, 50 ks Jupiter a 50ks Seifersdorfský) nepřežil žádný. Všechny znekrotizovaly nebo byly zahubeny vnitřní kontaminací a proces odvozování sterilní kultury pro rok 2017 byl zcela neúspěšný. V roce 2018 byl pokus opakován se změněným postupem.

Odvozování sterilní kultury v roce 2018

Již třetí den po přenesení vysterilizovaných explantátů na médium J5 bylo vidět, že segmenty, které původně rostly blíže k apikálnímu konci explantátu, černají a nekrotizují (Obr. 12 vlevo). Nodální segmenty o větších průměrech po dvou dnech nejevily žádnou známku nekrotizace a dva dny po přenesení na médium J5 bylo z celkového počtu 100 ks explantátu odstraněny jen 4 nekrotizující kusy.



Obr. 12 - Částečně nekrotizovaný (vlevo) a zcela zdravý (vpravo) jednodální segment, použity jako explantáty vhodné k odvozování sterilní kultury. Tyto explantáty byly kultivovány na médiu J5 po dobu tří dnů.

Po jednom týdnu kultivace a po třetím přenesení na čerstvé médium byla nalezena z celkového počtu 96 ks explantátů jen jedna nekrotizace a jedna vnější kontaminace. Nodální segmenty z distální části prýtu se tedy jeví jako vhodnější kandidáti na odvozování sterilní kultury, než apikální, které vykazují okamžitou nekrotizaci (Obr. 13).



Obr. 13 - Zcela nekrotický explantát vytvořený z apikální části juvenilního prýtu kultivaru Mars, kultivovaný po dobu jednoho týdne na médiu J5.

Po třech týdnech kultivace explantátů na médiu J5 nebyla sledována žádná další nekróza. Bazální části nodálních segmentů produkují kalus a pupeny začínají rašit (Obr. 14).



Obr. 14 - Rašící jednonodální segmenty ořešáku královského kultivaru Jupiter, které jsou kultivované na médiu J5 po dobu tří týdnů.

7.2 Fáze II – Optimalizace kultivačních podmínek pro množení ořešáku pomocí mikropropagace

Proces optimalizace kultivačních podmínek je časově velmi náročný. Jednotlivé pasáže na nová média probíhaly vždy po 5 týdnech kultivace a experimenty probíhaly kontinuálně od podzimu roku 2016 do dnešní doby.

Jako první bylo použito médium J2, které bylo navrženo na základě práce (Bourrain, 2009), ale s modifikovaným hormonálním složením. Již na tomto médiu byl pozorovaný stabilní růst všech explantátů, tedy médium se jeví jako vhodné pro kultivaci explantátů ořešáku královského (Obr. 15). Růst byl stabilní a již po pár týdnech bylo dosaženo stabilního počtu 35 ks explantátů na každý kultivar, tedy kultivováno bylo stabilně 245 explantátů ořešáku královského. U většiny explantátů (až 90 %) nebyla pozorována žádná nekróza. Kultivovaných bylo sedm různých semenáčů s označením S1 – S7.

Růst explantátů byl sice stabilní, nedocházelo k nekrotickým, ale růst byl velmi pomalý, a proto byl navržen další experiment a vytvořeno médium J4.



Obr. 15 - Explantáty semenáče S2, které byly na médiu J2 kultivované po dobu tří týdnů.

Médium J4 obsahuje jiné hormonální složení a jiné komponenty, které byly upraveny na základě nastudované literatury a na základě zkušeností získaných při kultivaci ořešáků na médiu J2.

Bylo pozorováno, že ořešáky semenáčů S1 – S7 na médiu J4 vykazují mnohem větší vitalitu a jejich růst je urychlen. Již po dvou týdnech bylo pozorováno, že explantáty dosahují průměrně vyššího růstu než explantáty na médiu J2 po třech týdnech (Obr. 15, Obr. 16). Dále byl pozorovaný větší výskyt postranních výhonů (Obr. 17). Na médiu J4 je tedy možné dosáhnout vyššího množícího koeficientu než na médiu J2. Médium J4 je proto vhodnější pro kultivaci ořešáku královského v *in vitro* podmínkách.

Vyhodnocovat růst jednotlivých explantátů se jeví jako nemožné. Každý explantát vykazuje jinou vitalitu. Explantáty stejného semenáče (S1 až S7) mají různé délky po stejném času kultivace, mají různý počet prýtů, různě vyvinutý kalus atd.



Obr. 16 - Explantáty ořešáku královského semenáče S4 kultivované na médiu J4 po dobu 14 dní.



Obr. 17 - Detail vyšší schopnosti rozvětňovat se u explantátů ořešáku královského semenáče S4 kultivované na médiu J4.

7.3 Fáze III – Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách

Experiment č. 1

Při tomto experimentu ani po měsíci kultivace na expresním médiu J.ex1 nebyla pozorována tvorba kořenového systému ani u jednoho z 15 použitých explantátů semenáče S4. Explantáty byly převedeny zpět na médium J4.

Experiment č. 2

Po 8 týdnech kultivace explantátů semenáče S4 na médiích Jin.1 + Jin.2 + Jin.3 a Jex.1 + Jex.2 v různých kombinacích byla provedena kontrola růstu kořenového systému u jednotlivých skupin explantátů. Následující fotografie ukazují výsledek tohoto experimentu.



Obr. 18 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.1 a Jex.1



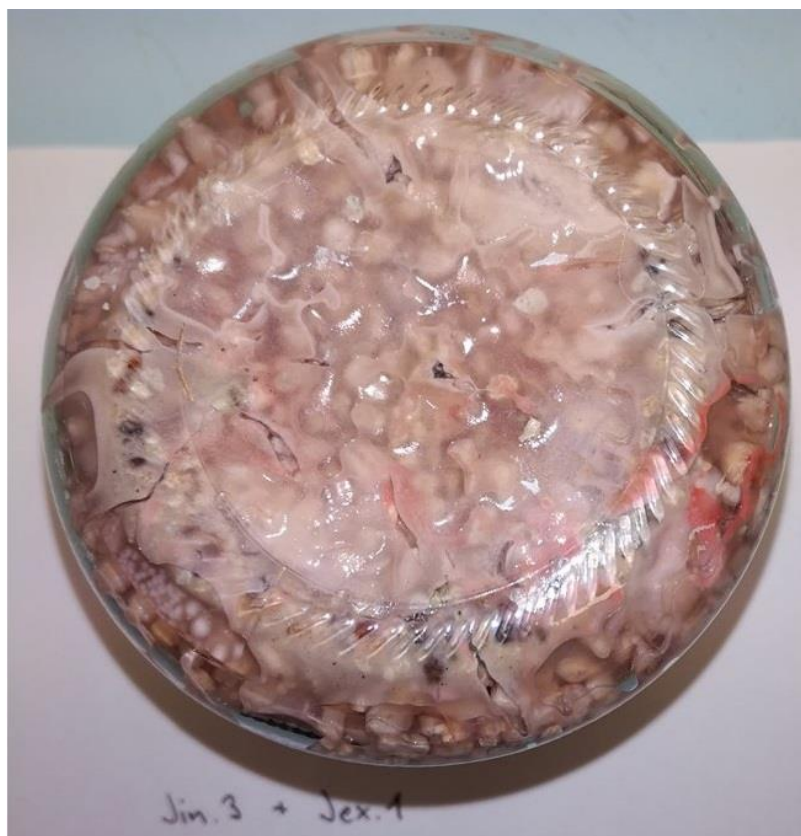
Obr. 19 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.1 a Jex.2



Obr. 20 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.2 a Jex.1



Obr. 21 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.2 a Jex.2



Obr. 22 - Kontaminace na médiu Jex.1 v experimentu dvoufázového zakořeňování explantátů semenáče S4 na médiích Jin.3 + Jex.1, která zapříčila smrt všech čtyř explantátů.



Obr. 23 - Explantáty semenáče S4 kultivované při dvoufázovém zakořeňování na médiích Jin.3 a Jex.2

Na základě vyhodnocení výsledků bylo pozorováno několik faktorů, které ovlivní budoucí experimenty se zakořeňováním explantátů ořešáků. Kořeny se u explantátů objevily pouze u vzorků rostoucích na expresním médiu Jex.2 (Vahdati, *et al.*, 2004; Allemand, *et al.*, 1992). Tento výsledek poukazuje na vhodnost použití expresního média se základem podle (Driver a Kuniyuki, 1984), tedy médium se základem DKW, podobně jako je základ DKW vhodný pro kultivaci explantátové kultury ořešáku královského.

Výška u explantátů hraje nejspíše roli při vytváření kořenového systému. Kořenový systém byl vytvořen u explantátů s délkou minimálně 2,5 cm, z čehož vyvozujeme, že menší explantáty nelze použít pro experiment indukce kořenění.

Po vyhodnocení tvorby kořenového systému *in vitro* byly všechny explantáty vyjmuty ze sterilních podmínek a zasazeny do rašeliny.

Po dostatečně dlouhé kultivaci v nesterilních podmínkách bylo zjištěno, že i po dodatečném ošetření práškovou IBA nedošlo většinou ke tvorbě kořenového systému u explantátu s výjimkou jediné rostliny, u kterého ale již byly pozorovány základy kořenového systému. Do květináčů byly tedy přesazeny pouze 4 (Obr. 24) rostlinky s kompletně vyvinutým kořenovým systémem.

Přes zimu a období dormance bohužel přežila jen jedna rostlina (Obr. 25)



Obr. 24 - Rostlinky semenáče S4 s plně vyvinutým kořenovým systémem, které byly zasazeny do květináčů a zahradnického substrátu a vysazeny k dalšímu růstu do skleníku.



Obr. 25 - Přeživší rostlina semenáče S4, která přežila zimu a úspěšně roste v nesterilních podmínkách.

8 Diskuse

Fáze I – Odvozování sterilní kultury

Odvozování stabilní kultury se na základě provedených experimentů jeví jako nejsložitější fáze z celého procesu *in vitro* mikropropagace ořešáku královského. Jelikož experimenty lze provádět pouze na jaře, kdy matečné rostliny opouští období dormance a jejich pupeny začínají rašit, je tento experiment časově nejnáročnější, a navíc omezen ročním obdobím.

Desinfekční protokol, který byl v této diplomové práci použit se opírá o výsledky (Al-Mizory, Azad, 2012), kteří ve své práci při povrchové sterilizaci použili mimo jiné i roztok HgCl₂. Na základě zkušeností ve firmě Jan Holub s.r.o. byla použita a modifikována desinfekce mimo jiné i roztokem HgCl₂. Tato povrchová sterilizace má 100% úspěšnost a všechny vzorky, které byly desinfikovány byly po nasazení na médium povrchově sterilní. Velkou zásluhu na popsané procentuální úspěšnosti má nejspíše i použití dlouhodobého proplachu v tekoucí vodě (Khoshkhoye, 2005). Proplach pod tekoucí vodou odplavuje velké množství povrchových patogenů, kteří se na explantátech mohou vyskytovat.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.2.2 v teoretické části diplomové práce, povrchová sterilizace u explantátu ořešáku královského je nejmenší problém. Explantáty byly nasazeny na médium J5 navržené speciálně na řešení popsaných problémů, které provází odvozování sterilní kultury této rostliny. Podle (Curir, *et al.*, 1985) bylo do média přidáno aktivní uhlí, které mělo navázat explantátem vypouštěné polyfenolické látky, které samotný explantát zahubí. Další přidanou látkou do média je komerční antibiotický přípravek PPM™ (Plant Preservation Mixture, Biotech.cz), jehož širokospektrální využití mělo zajistit vyřešení problému vnitřní kontaminace (Plantcelltechnology, 2018), která je podle pozorování (Obr. 5) přítomna ve všech explantátech ořešáku královského převzatých z přírody.

V roce 2017 bylo popsané médium J5 použito pro explantáty, které byly nasazeny ve formě vícenodálních juvenilních prýtů. Vícenodální segmenty byly každých 7 dní přepasážovány na čerstvé médium a pokaždé byla pozorována nekróza bazální části explantátu. Tato nekróza sice byla každý týden odstraněna, ale i přesto nakonec 100 % explantátů zahynulo. Jelikož médium, které obsahuje aktivní uhlí, je černé (Obr. 8), nebylo

možné vysledovat, zda za nekrózu může vnitřní kontaminace, či vypouštění polyfenolických látek do média, což se projevuje jako viditelné hnědnutí média.

Zlepšení situace a řešení některých problémů z roku 2017 přinesly modifikace odvozovacího protokolu v roce 2018. V tomto experimentu byly použity jednodálňní explantáty (Bourrain, 2009) s cílem nechat vyrůst a následně odizolovat rašící nodální pupeny, které by, jakožto meristemické pletivo, měly být prosté kontaminací a polyfenolických látek. Další modifikací bylo zajištění častějšího přenášení explantátů na čerstvé médium (Long, *et al.*, 1995).

Tyto změny zajistily, že explantáty rostoucí na médiu J5 projevovaly mnohem vyšší vitalitu, než explantáty v roce 2017. Výsledky z roku 2018 také potvrdily, že jednodálňní segmenty jsou pro odvozování sterilní kultury vhodnější, což potvrzují například i výsledky autora (Bourrain, 2009), který jednodálňní segmenty také úspěšně použil.

Na explantátech použitých v roce 2018 nedocházelo k nekróze bazálních částí a pupeny vykazovaly stabilní růst. Tento experiment, společně s výsledky z roku 2017, zároveň potvrdil, že použití apikálních částí juvenilních prýtů je nevhodné k odvozování sterilní kultury, protože opět docházelo k nekrotickým bazálním částím (Obr. 12, Obr. 13).

Naopak u jednodálňních explantátů z distální části stonku se i po třech týdnech kultivace neprojevila žádná nekróza, ale naopak docházelo ke tvorbě kalusu u bazální části explantátů a nodální pupeny rašily. Většina explantátů v roce 2017 byla za tuto dobu již zcela nekrotická. Výsledkem těchto experimentů je tedy potvrzení, že k odvozování sterilní kultury jsou vhodnější jednodálňní segmenty z distální části juvenilního prýtu a že úspěšnost odvozování závisí také na frekvenci pasáží na čerstvé médium.

Bylo vyzorováno, že explantáty zkušebně odvozené z přírody, které byly kultivovány na médiu J4, byly ve velmi krátkém čase zahubeny vlastní kontaminací (Obr. 5), či polyfenolickými látkami. Lze tedy předpokládat, že použití antibiotického přípravku a aktivního uhlí je přínosné. Častější pasáže mohou také zaručit, že případné vnitřní kontaminace a polyfenolické látky, nestihnou explantát zahubit.

Dalším krokem v projektu mikropropagace ořešáku královského bude izolace rašících pupenů z jednodálňních segmentů a jejich pasáž na navržené médium J4, kde bude zajištěna stabilní produkce sterilních rostlin. U těchto rostlin bude zaručena odrůdová pravost.

Fáze II – Optimalizace podmínek kultivace ořešáku královského pomocí mikropropagace

V této fázi byla navržena dvě různá média, jejichž základem byly informace nastudované v teoretické části diplomové práce. Tato média by měla zaručit stabilní růst explantátů ořešáku královského *in vitro*. Podle výsledků různých autorů (Payghamzadeh, *et al.*, 2011) byla navržena média se základem DKW (Driver a Kuniyuki, 1984), na kterém bylo v průběhu let výzkumů dosaženo nejlepších výsledků, společně s médii se základem MS. Médium se základem MS nebylo použito z důvodu, že DKW médium bylo navrženo speciálně pro mikropropagaci ořešáku královského (Driver a Kuniyuki, 1984).

Již první modifikované médium s označením J2, jehož základ tvořily látky podle (Bourrain, 2009), působilo příznivě na explantáty ořešáku královského a v podmínkách kultivace bylo dosaženo stabilního růstu. Na základě (Moyo, *et al.*, 2018), byla navržena změna hormonálního složení média podle (Bourrain, 2009). Autoři zjistili, že při kultivaci explantátů na médiu obsahující mT v různých koncentracích bylo dosaženo lepších výsledků oproti médiím obsahujícím BA. Explantáty rostliny *Amelanchier anifolia*, kterou autoři použili, rostly s mT nejlépe, měly nejvíce postranních výhonů a nejlepší zakořeňovací schopnost. Tyto kladné výsledky pro růst na médiu obsahující mT potvrzují také (Werbrouck, *et al.*, 1996), kteří použili rostlinu *Spathiphyllum floribundum*. Tento hormon byl proto použit i v této diplomové práci s cílem zlepšit růstové podmínky pro explantáty ořešáku královského.

Na základě vlastních výsledků lze předpokládat, že použití mT má příznivý vliv na explantáty ořešáku královského, jejichž kultivace je jinak velmi složitá. Explantáty na médiu J2 rostly stabilně, nedocházelo k nekrózám a celková vitalita rostlin byla uspokojující.

Použití média s mT bylo také navrženo, z důvodů zajištění lepší přípravy explantátů na fázi zakořeňování. BA má oproti mT schopnost se kumulovat v bazální části explantátu a tím negativně působit na zakořeňovací schopnosti explantátu (Moyo, *et al.*, 2018). Kořenící schopnost explantátů ořešáku královského je i tak velmi malá (Navatel a Bourrain, 2001) a použití hormonu mT by procentuální výtěžnost kořenění ořešáku královského *in vitro* mohlo zvýšit. Hormon mT má jiné chemické složení než BA (Werbrouck, *et al.*, 1996), které mimo jiné

zaručuje, že se v bazální části rostliny kumulovat nebude, a proto je podpořeno lepší kořenění explantátů.

Další modifikované médium J4 bylo navrženo tak, aby bylo dosaženo ještě lepšího růstu a vyššího množícího koeficientu. V médiu J4 bylo zcela eliminováno použití hormonu BA a byly sledovány případné změny v růstu explantátu na médiu obsahující pouze hormon mT. Médium J4 se na základě výsledků jeví jako vhodnější pro kultivaci explantátů ořešáku. Bylo dosaženo vyššího vzrůstu v kratším čase a explantáty prokazovaly vyšší množící koeficient ve 100 % případů.

I po měsících kultivace na tomto médiu je růst explantátu stabilní a produktivní. Ořešáky vykazují vyšší hodnotu množícího koeficientu a dlouhivého růstu, a proto lze explantáty exponenciálně množit a zajistit tak stabilní produkci rostlin. Dochází také k minimu nekróz. Použití hormonu mT, jako hormonu nahrazující běžně používaný BA, bylo experimentálně vyhodnoceno jako vhodné pro kultivaci explantátu ořešáku královského.

Tato fáze experimentů byla provedena úspěšně a podmínky pro kultivaci byly uznány jako stabilní a funkční. Použití hormonu meta-Topolinu je vhodné pro kultivaci ořešáku královského *in vitro*. Explantáty na médiu rostou a následné experimenty budou zaměřeny na další vylepšení kultivačních podmínek a zajištění nejrychlejšího možného růstu spolu s vysokým množícím koeficientem, aby výsledná produkce pravokořeněných ořešáků byla co nejvyšší a nejvýhodnější.

Fáze III – Indukce kořenění u explantátů a následná aklimatizace rostlin v nesterilních podmínkách

Pro zakořeňování explantátů zkoumaného rostlinného druhu bylo použito dvoufázového zakořeňování *in vitro*, které jako první provedl (Jay-Allemand, *et al.*, 1992), a které podle jeho výzkumu dosahovalo lepších výsledků, než zakořeňování v půdě (Driver a Suttle, 1987; Driver a Kuniyuki, 1984).

Pro experimenty byly použity semenáče S1-S7, u kterých již byl zajištěn stabilní růst *in vitro* na médiu J4. I přesto, že růst na médiu J4 je v našich podmínkách stabilní, nebyl bohužel

zajištěn dostatek materiálu pro statisticky významnější experimenty, u kterých by bylo použito více vzorků.

Pro výzkum zakořeňování ořešáku *in vitro* bylo v průběhu let navrženo několik různých médií pro indukční i expresní fázi, které obsahují nejrůznější modifikace. Pro vlastní experiment bylo tedy navrženo více různých médií, které byly pro výzkum použity ve všech různých kombinacích. Média byla navržena se základy podle (Bourrain, 2009; Vadhati, *et al.*, 2004; Allemand, *et al.*, 1992). Bylo zjišťováno, které z těchto navržených médií je vhodné pro indukci kořenění.

Explantáty, které byly kultivované na indukčních médiích byly kultivovány bez světla, protože ve tmě dochází k rozdílné distribuci a aktivitě hormonů v rostlině, a tedy signály v rostlině iniciující tvorbu kořenového systému by měly být aktivnější (Sadaat a Hennerty, 1999). V expresních médiích byla použita modifikace podle (Jay-Allemand, *et al.*, 2009), kdy byl do média přidán vermikulit. Podle autora by se tímto krokem měla zlepšit kvalita, rozvětvení a pevnost výsledných kořenových systémů.

V prvním experimentu byla použita expresní a indukční média podle (Burrain, 2009), které tvořily základ média MS. Podle vlastních výsledků z prvního i druhého experimentu se média se základem MS jeví jako nevhodné pro indukci kořenění u ořešáku. Výsledky neprokázaly tvorbu kořenového systému ani u jednoho explantátu kultivovaném na médiu se základem MS.

Ve druhém experimentu bylo dokázáno, že kořenový systém se vytvořil pouze u explantátů kultivovaných na indukčních expresních médiích podle (Vadhati, *et al.*, 2004; Allemand, *et al.*, 1992), a to jsou média, která tvoří základ DKW (Driver a Kuyunuki, 1984). V této diplomové práci bylo tedy již vícekrát dokázáno, že použité médií se základem DKW je vhodné pro mikropropagaci ořešáku královského.

Jak již bylo dříve naznačeno, použití hormonu mT (Moyo, *et al.*, 2018; Werbrouck, *et al.*, 1996) by mělo mít také kladný význam na tvorbu kořenového systému. Ve fázi optimalizace experimentu pro tvorbu kořenového systému u explantátu ořešáku královského budou navrženy experimenty, které porovnájí použití mT a BA při kultivaci ořešáku *in vitro* a následné indukce tvorby kořenových systémů. Pro další experimenty budou selektována média, která

dosahují nejvyšší míru tvorby kořenového systému a bude se sledovat i vliv kultivačních podmínek (například tma při indukční fázi).

Na základě výsledků této diplomové práce bylo při aklimatizaci explantátů zjištěno, že nemá smysl používat explantáty, které si vlastní kořenový systém nevytvořily již v expresní fázi *in vitro*. Na základě práce (McGrahaman, *et al.*, 1987) byly explantáty bez kořenového systému ošetřeny dodatečně 0,5% IBA v talku. Explantáty, které byly kultivovány na některém z navržených indukčních a expresních médií a dodatečně ošetřeny práškovou IBA si nevytváří kořenový systém v nesterilních podmínkách. Proces aklimatizace v substrátu v PE nádobách přikryté pórovitou fólií se tedy jeví jako vhodný pouze pro explantáty, které vlastní kořenový systém mají vytvořený již z *in vitro* prostředí. Tyto rostliny neznekrotizovaly a úspěšně se na nesterilní prostředí aklimatizovaly.

V další fázi bude projekt zaměřen mimo jiné na kultivaci již aklimatizovaných rostlin v nesterilních podmínkách. Bude třeba vytvořit podmínky vhodné pro pěstování ořešáků královských tak, aby bylo dosaženo maximální efektivity produkce pravokořenných ořešáku královských. V dalším výzkumu bude tedy sledován například efekt pH použitého substrátu, teplotní a vlhkostní podmínky v prostorech, kde se budou pravokořenné ořešáky pěstovat.

9 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá metodikou mikropropagace ořešáku královského (*Juglans regia*, L.) *in vitro*. Použití mikropropagace by náročný proces vegetativního množení ořešáku výrazně zlevnilo, zjednodušilo a časově zvýhodnilo. Rostliny kultivované *in vitro* by měly zajištěnou odrůdovou stálost, byly by prosté chorob a byl by zajištěn vyšší množící koeficient. Cíle diplomové práce jsou shodné s jednotlivými fázemi procesu množení ořešáku královského *in vitro*.

V první fázi diplomové práce byly provedeny experimenty s cílem odvodit sterilní *in vitro* kulturu. Po nastudování literárního základu byl navržen postup povrchové i vnitřní sterilizace a samotné odvozovací médium. Sterilizační protokol byl úspěšně aplikován a navržené médium se jeví jako vhodné pro odvozování sterilní kultury ořešáku královského. Po sérii experimentů bylo zamezeno úhynu explantátů kvůli vnitřním kontaminacím a polyfenolickým látkám.

Ve druhé fázi byla navržena kultivační média pro optimalizaci růstu explantátů *in vitro*. Explantáty se podařilo úspěšně stabilně kultivovat na navržených médiích a byla i úspěšně zavedena hormonální modifikace v médiích, které se na základě výsledků jeví jako vhodné pro kultivaci ořešáku královského *in vitro*. Hormonální modifikace spočívala v použití hormonu meta-Topolin místo běžně používaného 6-Benzylaminopurinu. Tato modifikace měla pozitivní výsledky a byla úspěšně zavedena do protokolu kultivace ořešáku královského.

Ve třetí fázi experimentální části diplomové práce bylo třeba zajistit kořenění explantátů a jejich aklimatizaci *ex vitro*. Byly navrženy experimenty dvoufázového zakořeňování *in vitro* a několik různých indukčních a expresních médií. V některých případech bylo dosaženo tvorby kořenových systémů a některé *in vitro* zakořeněné rostliny se podařilo úspěšně aklimatizovat *ex vitro*.

I přesto, že ořešák královský je rostlina, jejíž mikropropagaci provází mnoho problémů, cíle diplomové práce byly splněny. V budoucnu budou provedeny další experimenty, které zahrnují mimo jiné například optimalizaci koncentrací použitých hormonů či selekci nejvhodnějších indukčních a expresních médií. Poté bude možné zavést první stabilní protokol pro množení ořešáku královského pomocí *in vitro* mikropropagace v České republice.

10 Seznam literatury

Al-Mizory, L. *et al.*, „*In vitro* propagation of walnut (*Juglans regia*) by nodal explants.“, *Journal of Agricultural Science and Technology. B* 2.6 B (2012): 665

Allemand, J., *et al.* „Juvenility and physiology of rhizogenesis in two woody species (*Sequoia sempervirens* and *Juglans nigra* x *Juglans regia*).“, *Colloques de l'INRA* (France) (1995)

Amaral, J. S., *et al.* „Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal.“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51.26 (2003): 7698-7702

Bhatia, S., *et al.* „Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences.“, Academic Press, (2015)

Bílek, O., *et al.* „Štěpování“, SZN, (1975)

Bourrain, L., „*In vitro* walnut micropropagation of *Juglans regia* L. application.“, COST, (2009)

Cosmulescu, S, *et al.*, „Determination of apomictic fruit set ratio in several Romanian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars.“, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40.1, (2012): 229

Curir, P., C. Damiano, a T. Cosmi. „*In vitro* propagation of some rose cultivars.“, 1. International Symposium of the Research and Cultivation of Roses, 189, (1985)

Czech Republic Interactive Plant Hardiness Zone Map, „Plant Maps - Plant, Tree ,Gardening ,Climate and Hardiness Zone Maps“, [online], Copyright ©2018 plantmaps.com, [cit. 19.03.2018], Dostupné z: <http://www.plantmaps.com/interactive-czech-republic-plant-hardiness-zone-map-celsius.php>

DeBuse, C., *et al.*, „Walnut clonal Paradox rootstock trials in Northern California.“, (2010)

DeSmallekamp.nl, catalog, [online], Copyright DeSmallekamp.nl ©, [cit. 12.02.2018]. Dostupné z: <https://www.desmallekamp.nl/en/catalog>

Driver, J. A. a A. H. Kuniyuki, „*In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock (*Juglans hindsii* X *Juglans regia*) tissue culture.“, *HortScience* (USA), (1984)

Driver, J. A., and G. R. L. Suttle. „Nursery handling of propagules.“ Cell and tissue culture in forestry, Springer Netherlands, (1987): 320-335

Dvořák, A., „Atlas odrůd ovoce.“, SZN, (1978)

Gautam, D. R., a J. S. Chauhan. „A physiological analysis of rooting in cuttings of juvenile walnut (*Juglans regia* L.).“, I International Symposium on Walnut Production 284, (1989)

Guoliang, W., *et al.*, „‘Qinquan 1’, a new apomixis walnut cultivar.“ Fruits 65.1, (2010): 39-42

Güneş, T., „An investigation on rooting of *Juglans regia* L. hardwood cuttings.“, Turkish Journal of Botany 23.6, (1999): 367-372

Heupke, F., „Zur Diätbehandlung des Praktischen Arztes.“, (1951), Berlin

Hilkenbäumer, F., „Ostbau“, Grundlagen, Anbau u. Betrieb.“, (1953), Berlin

Hladík, F., „Malá pomologie.“, 1. vydání. Praha, SZN, (1966): 321

Iliev, I., *et al.*, „Plant micropropagation.“ Plant cell culture: essential methods, (2010): 1-23

Jabůrek, V., [online], „Základní botanicko – morfologická charakteristika vlašského ořešáku.“, (2008), Dostupné z: <http://zahradaweb.cz/zakladni-botanicko-morfologicka-charakteristika-vlasskeho-oresaku/>

Jay-Allemand, C., P. Capelli, a D. Cornu, „Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium.“, Scientia Horticulturae 51.3-4 (1992): 335-342

Khoshkhoy, M., „Tissue Culture Technique for Gardening Plant Vol 2.“, Iran, Shiraz University Press (2005): 453

Kleyn, J., Kyte L., „Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation.“, Timber press, (2013)

Kováč, J., „Explantátové kultury rostlin. 1. vydání.“, HippoWare, Ústí nad Labem, (1992)

Leal, D., *et al.*, „Micropropagation of *Juglans regia* L.“, Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, (2007): 381-390

Lloyd, G., and B. McCown., „Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture.“, 30, (1980): 421-427

Long, L. M., J. E. Preece, and J. W. Van Sambeek, „Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut).“, Plant cell reports 14.12 (1995): 799-803

Lopez, J. M., „Walnut tissue culture: research and field applications.“, (2004)

McGranahan, G. H., J. A. Driver, and W. Tulecke, „Tissue culture of *Juglans*.“ Cell and tissue culture in forestry. Springer Netherlands, (1987): 261-271

Moyo, M., *et al.*, „Deciphering the growth pattern and phytohormonal content in Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia*) in response to *in vitro* cytokinin application.“ New biotechnology 42 (2018): 85-94.

Murashige, T. a F. Skoog, „A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.“ Physiologia plantarum 15.3 (1962): 473-497

Navatel, J. C., a L. Bourrain, „Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication.“, Acta horticulturae, (2001)

Tomáš, J., „Přehled doporučených odrůd skořápkovin.“, Ovocnářská unie České republiky (2012), [online], Copyright © [cit. 06.03.2018]. Dostupné z: <http://www.ovocnarska-unie.cz/>

Payghamzadeh, K. a S. K. Kazemitabar, „*In vitro* propagation of walnut – A review.“, African Journal of biotechnology 10.3, (2011): 290-311

Plant Cell Technology, „PPM Product Information.“ Plant Cell Technology [online], (2018) Dostupné z: <https://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information/>

Preece, J. E., *et al.*, „Biotechnology: *in vitro* studies with walnut (*Juglans*) species: the continuing quest for quality.“ Proceedings of the 4th Black Walnut Symposium, Carbondale, Illinois, Walnut Council, Indianapolis, (1989)

Revilla, M. A., J. Majada, a R. Rodriguez, „Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation.“, Annales des Sciences Forestières. Vol. 46. No. Supplement. EDP Sciences, (1989)

Rodriguez, R., *et al.*, „Walnut (*Juglans* spp.).“, Trees II. Springer, Berlin, Heidelberg, (1989): 99-126

Saadat, Y. A., a M. J. Hennerty, „The effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.).“, Acta Horticulturae 544, (1999): 473-480

Saadat, Y. A., a M. J. Hennerty, „Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.).“, Scientia Horticulturae 95.3, (2002): 251-260

Smyers, D. R., „Rooting study of mature red oak and black walnut stem cuttings treated with high concentrations of IBA.“, Diss. Kansas State University, (1977)

Šobek J., „Ořešák a jeho pěstování.“, 1. vydání, Praha, ČSAV, (1958): 336 s

Tarinejad, A., „Effects of disinfectants and antibiotics on contamination during propagation of walnut (*Juglans regia* L.).“, Research on crops 14.1, (2013): 219-225

USDA Plant Hardiness Zone Map, „USDA Plant Hardiness Zone Map.“ [online]. (2018), dostupné z: <http://planthardiness.ars.usda.gov/PHZMWeb/>

Vahdati, K., *et al.*, „Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars.“ HortScience 39.2, (2004): 324-327

Zarubin, A. F., „Vosstanovlenije i razvitije orechovo-plodovych lesov južnoj Kirgizii.“, Moskva Akad., (1954)