

Česká zemědělská univerzita v Praze



Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra dendrologie a šlechtění lesních dřevin

Obor: Hospodářská a správní služba v lesním hospodářství

Bakalářská práce

Možnosti in vitro mikropropagace lesních dřevin

In vitro micropropagation of forest trees

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jan Vítamvás, Ph.D.

Vypracovala: Lenka Laštovková

Praha, 2012



Česká zemědělská univerzita v Praze
Katedra: dendrologie a šlechtění lesních dřevin

Fakulta lesnická a dřevařská
Akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

pro: **Laštovková Lenka**

obor: **Hospodářská a správní služba v lesním hospodářství**

Název tématu: **Možnosti *in vitro* mikropropagace lesních dřevin**

Název tématu v anglickém jazyce: ***In vitro* micropropagation of forest trees**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracování literární rešerše k problematice množení lesních dřevin
2. Současné trendy v *in vitro* pěstování lesních dřevin v ČR a ve světě
3. Zhodnocení ekonomické stránky pěstování lesních dřevin při množení pomocí *in vitro* metod



Rozsah grafických prací:

Rozsah průvodní zprávy: cca 30 stran

Seznam odborné literatury:

Paule, L., 1992: Genetika a šlechtění lesných dřevin. Příroda, Bratislava. 304 s.

Šebánek J., Sladký Z., 1988: Biotechnologie rostlinných explantátů. Vysoká škola zemědělská Brno. 100 s.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: 14. 6. 2010

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. 4. 2011



Handwritten signature

Vedoucí katedry

Handwritten signature

Děkan

V Praze dne 22. 6. 2010

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma: „Možnosti in vitro mikropropagace lesních dřevin“ vypracovala samostatně za použití uvedené literatury a po odborných konzultacích s vedoucím bakalářské práce Ing. Janem Vítámvás, Ph.D.

V Praze dne 30. dubna 2012

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Janu Vítámvásovi Ph. D. za odborné vedení bakalářské práce a dále za poskytnutí podkladových materiálů a odborných konzultací. Děkuji také Ing. Romanu Sloupovi, Ph.D za poskytnutí odborných konzultací. Též chci poděkovat svým rodičům Lence a Zdeňkovi Laštovkovým za podporu při studiu. Můj vděku patří také všem, kteří mě po celou dobu studia podporovali a pomáhali. Především rodině, příteli a přátelům hlavně Lukášovi T. Všem děkuji.

ABSTRAKT

Téma mé bakalářské práce je množení in vitro mikropropagace lesních dřevin. V první části tohoto textu je popis klasických metod rozmnožování, vegetativních a generativní. Hlavním tématem je metoda in vitro a tato metoda je podrobně popsána ve zbytku této práce. Naleznete zde popis metody, její výhody, nevýhody. Je zde popsána historie této metody, výroba živného média a převod kultury do nesterilních podmínek. V poslední části je zpracované ekonomické porovnání klasických metod a metody in vitro.

Klíčová slova: in vitro kultury, explantát

ABSTRACT

My bachelor work deals with in vitro propagation of forest tree species. There is description of various methods of multiplication, both generative and vegetative. Main focus is put on in vitro propagation – there is a description of this method, history, it's advantages and disadvantages, její výhody, nevýhody. Also there is a description of nutrient medium production and transfer of the sterile plant into non-sterile conditions. At the end, there is a comparison of classical methods of propagation and in vitro propagation.

Obsah

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD.....	9
1. 1. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2. 1. DRUHY ROZMNOŽOVÁNÍ	11
2.1.1. Generativní rozmnožování	11
2.1.1. Vegetativní rozmnožování.....	11
3. IN VITRO VEGETATIVNÍ MNOŽENÍ ROSTLIN	23
3. 1. VÝZNAM IN VITRO METODY	23
3. 2. HISTORIE.....	25
3. 3. MATERIÁL A METODY	26
3. 3. 1. Materiál pro založení explantátové kultury	26
3. 3. 2. Ošetření po odběru materiálu	26
3. 3. 3. Založení sterilní kultury	27
3. 3. 4. Živná média.....	27
3. 3. 4. 1. Růstové regulátory	28
3. 3. 4. 2. Ostatní látky obsažené v médiích.....	30
3. 3. 4. 3. Fyzikální podmínky pěstování	31
3. 3. 5. Průběh růstu kultur	32
3. 3. 5. 1. Růst explantátů.....	32
3. 3. 5. 2. Přesazování rostlin (explantátů).....	33
4. VÝSLEDKY.....	39
4. 1. VÝROBA ŽIVNÉHO MÉDIA S NÁZVEM, MS „(MURASHIGE A SKOOG, 1962)	39
5. SHRnutí ZÍSKANÝCH DAT	50
6. EKONOMICKÉ ZHODNOCENÍ	51
7. ZÁVĚR.....	55
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
9. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	59
10. PŘÍLOHY	61

1. Úvod

Pro množení lesních dřevin je v dnešní době zapotřebí zkrátit reprodukční cyklus. Snažíme se v co nejkratším čase namnožit co nejvíce jedinců. Používáme k tomu vegetativní množení, protože za pomoci normálního způsobu generativního množení tedy ze semen to trvá velice dlouho. Výhody vegetativního množení jsou hlavně rychlost množení požadovaných vlastností. Víme, s jakými vlastnostmi pracujeme, námi určené vlastnosti můžeme zachovat pro pozdější práci. Největší nevýhodou je finanční náročnost.

Při vegetativním množení může vzniknout velké množství jedinců s naprosto shodnými vlastnostmi mateřské rostliny. K vegetativnímu množení používáme části rostlin, které jsou schopny zakořenit. Toto množení používáme tam, kde se semena tvoří špatně nebo vůbec, neklíčí nebo rostlina ztrácí vlastnosti mateční rostliny.

Tato metoda využívá skutečnosti, že v každé buňce je uložena komplexní genetická informace o daném jedinci. Proto fakticky stačí odebrat několik buněk z pletiv či tkání, iniciovat jejich růst a posléze vypěstovat nového jedince z totožnou genetickou informací. Avšak cesta od několika buněk k novému jedinci je složitá a skrývá mnohá úskalí, přesto ji lze považovat po technickém zvládnutí za perspektivní. Problém je v tom, že každý druh má své specifické zvláštnosti a nároky na podmínky vegetativního rozmnožování metodou *in vitro*. Dokonce i jednotlivé matečné stromy, z nichž se odebírá materiál k dalšímu rozmnožování, mají své individuální nároky na kultivační média. Celý proces musí probíhat v přísně sterilním prostředí, protože infekce způsobená různými bakteriemi či houbami může negativně ovlivnit růst nových rostlinek. Proto trvá dosti dlouhou dobu (až jeden rok), než se podaří získat primární kulturu - klon (malou rostlinku žijící v přísně sterilním prostředí, uzavřenou ve sklenici).

1. 1. Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je popsat klasické metody množení lesních dřevin. Dále podrobné představení metody in vitro a na závěr ekonomicky porovnat klasické metody a metody in vitro.

2. Literární přehled

2. 1. Druhy rozmnožování

Existují dva základní typy množení, a to generativní (ze semen) a vegetativní (části jedinců oddělených od mateřské rostliny, tyto části se po oddělení dále využívají k tvorbě nové samostatné rostliny).

2.1.1. Generativní rozmnožování

Generativní rozmnožování rostlin je pohlavní rozmnožování pomocí semen. Rozmnožování spočívá v oplodnění jedné samičí pohlavní buňky buňkou samčí. Nová rostlina není geneticky shodná s mateřskou rostlinou. Při pohlavním rozmnožování jsou dva typy opylení buď vlastním, nebo pylem jiné rostliny stejného druhu (Kováčik a kol., 1983).

2.1.1. Vegetativní rozmnožování

Vegetativní rozmnožování rostlin je nepohlavní rozmnožování. Nová rostlinka je generativně shodná s mateřskou rostlinou. Vegetativní rozmnožování rostlin používá části rostlin, jak nadzemní části listy, pupeny, výhonky, tak i podzemní části rostliny, kořeny a odnože. Vegetativní rozmnožování lesních dřevin má významnou úlohu při zachování genofondů ohrožených lesních dřevin (Chalupa, 1990).

Mezi metody vegetativního množení patří (Bärtels 1988)

- autovegetativní rozmnožování
 - dělení kořenovými výmladky
 - kopčení
 - hřížení a potápění
 - řízkování
- xenovegetativní rozmnožování –(v současnosti se používá pojem heterovegetativní)
 - štěpování (roubování)

Dělení kořenovými výmladky

Tato metoda je rychlá a používá se u hlavně u keřů, které se zmlazují za pomoci výhonků z kořenových krčků. Mateřské rostliny se na jaře nebo v podzimním létě po vyzrání výhonků vyjmou ze země a rozsadí se. Vyjmutému výhonku musí zůstat alespoň jeden olistěný výhon s kořeny. Tyto výhony se přesadí do studeného pařeniště. Po vytvoření nových kořenů se přesadí na pěstební záhon, nebo se nechají v pařeništi.

Kopčení

Zakořenění probíhá přímo na mateřských rostlinách. Nová rostlina se odděluje až po dobrém zakořenění. Mladé rostliny se nazývají oddělky. Výsadba nových matečních rostlin se provádí na podzim nebo zjara. Rostliny se zastříhnou a sází se. Výchozí materiál musí být viruprostý. Mateční rostlina se používá po mnoho let. Na podzim je třeba sestříhat všechny výhony těsně nad zemí a rostliny přihnout zeminou. Na jaře nové výhony cca 20 cm zakopčeme. Po zakopčení letorosty vyčnívají na výšku dlaně. Konečné zahrnutí je ve výšce 20 – 30 cm. Kopčení je dokončeno ke konci června. Po opadu listů půdu odstraníme

a odstříhneme u místa vyrašení kvalitně zakořeněné výhony. Mateční rostlinu opět přihnojíme a zazimujeme.

Hřížení a potápění

Tyto metody se již dnes nepoužívají. Při hřížení se výhony založí do úzké rýhy v zemi. Výhony se ohnou krátkým obloukem. Rýhy se zasypou a dobře udusají. Špička prutu vyčnívá se země ven. Pro lepší vytvoření kořenů je důležitý krátký ohyb. Opakovaným obrůstáním mateční rostliny vzniká vždy nový materiál pro hřížení. Při potápění se kolem mateřské rostliny vyryjí rýhy dlouhé jako celý výhon. Krátkým obloukem výhon do rýhy ohneme a pevně připícheme háčky po celé délce. Rýha zůstává otevřená. Po dosažení 10 -15cm výšky se výhony přihnou. Tato metoda se provádí brzo na jaře. Při této metodě probíhá zakořeňování snáze a získáváme více mladých rostlin.

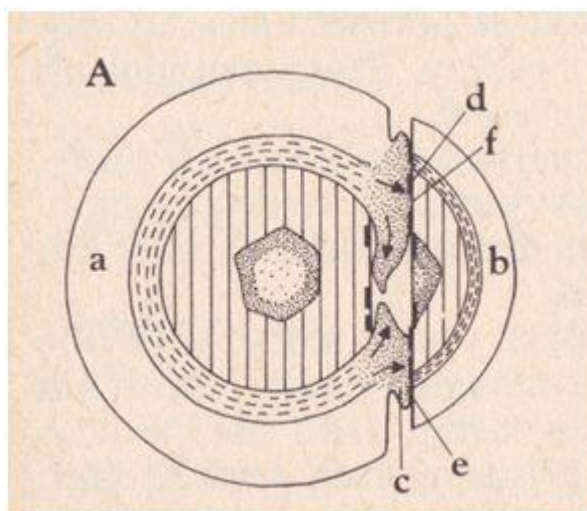
Řízkování

Rozmnožování řízky:

1. Kořenovými – základ je dělení a odebrání kořenů na nové rostlinky.
2. Dřevitými řízky – odebráním silně narostlých vyzrálých letorostů, které se zpracovávají po celé délce.
3. bylinnými řízky – oddělitelné části rostlin neboli olistěné výhony (pupeny nebo listy), které po oddělení necháme zakořenit, a z nich vyrůstají samostatné rostliny.

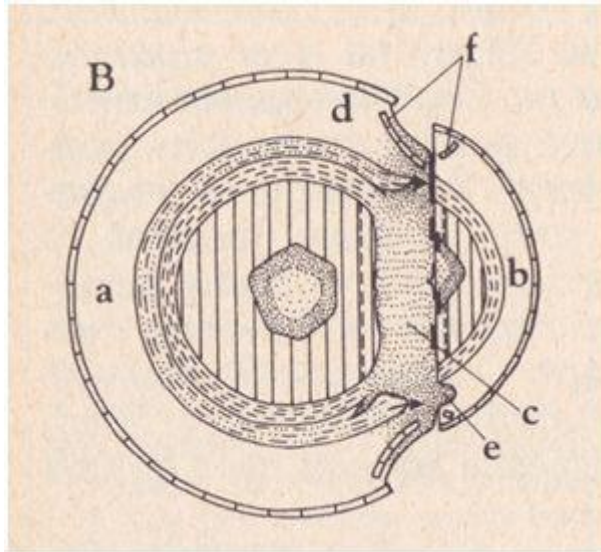
Štěpování (roubování)

Štěpení je způsob, při němž se rozmnožovaná dřevina přiměje ke srůstu s podnožovou rostlinou. Tato metoda je snadno proveditelná a dává kvalitní nové rostliny. Je to jedna z častých používaných způsobů. Podle Brauna (1959) se srůstání podnože s roubem probíhá ve třech fázích na obrázku č. 1, 2, 3 můžeme vidět tyto srůstové pochody.



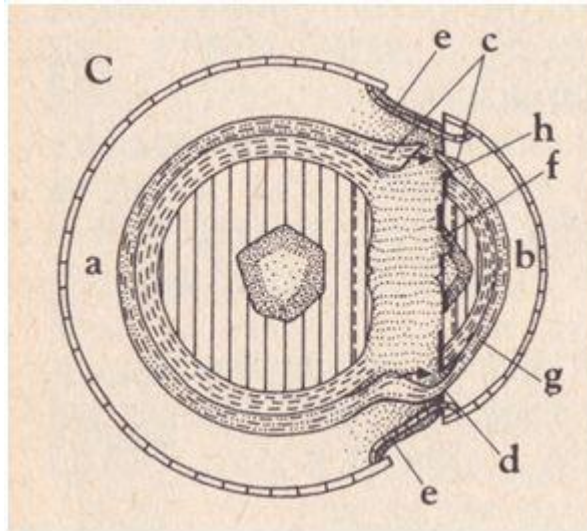
Obr. č. 1: srůstové pochody při srůstání podnože a roubu

A-první kontakty mezi podnožím a roubem (a-podnož, b-roub, c-primární intermediární pletivo (tečkováno), d-jednoduchá dělicí zóna tvořená zónou poranění podnože, jejíž intermediární pletivo ji přitlačuje na dřevo roubu, e-dvojitá dělicí zóna tvořená zónami poranění podnože a roubu, f-přímé kontakty buněk mezi živými buňkami intermediárního pletiva podnože a odumřelými buňkami dřeva roubu) (Braun, 1959 in Bärtels, 1988).



Obr. č. 2: vývojový stav ve druhém úseku srůstání

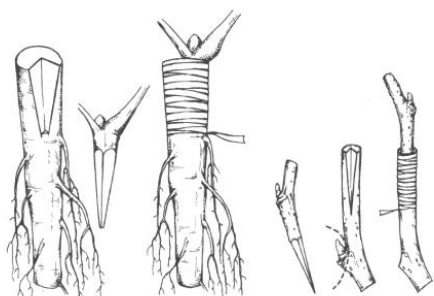
(a-podnož, b-roub, c-intermediární pletivo vycházející z podnože, které právě přešlo do sekundárního stavu, d-růst dřeva podnože po naroubování (čárkováno a tečkováno), e-vznikající parenchymové můstky, f-ránový periderm), směry šišek na kresbách ukazují na přísně lokalizované a směrované první růstové pochody v intermediárním pletivu, které začínají ve výši kambia roubu a směřují do kůrového pletiva ležícího bezprostředně pod kambiem (Braun, 1959 in Bärtels, 1988).



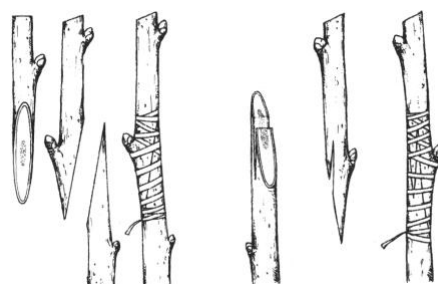
Obr. č. 3: stav krátce před úplným srůstem

(a-podnož, b-roub, c-výběžky kambia roubu a podnože do parenchymových mŕstků, d-právě dokončené spojení kambii, kambialní mŕstek, e-spojení peridermu, f-tvoření parenchymového mŕstku intermediárního pletiva podnože v oblasti periferní dřeně roubu, tento pochod nemá žádný další význam, g-po vytvoření parenchymových mŕstků nyní nastává i v roubu obnovena tvorba dřeva, h-vznikající parenchymové mŕstky), směry šipek-místa parenchymových mŕstků (Braun, 1959 in Bärtels, 1988).

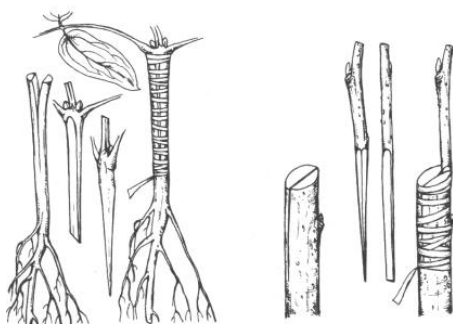
Na obrázku číslo 4 – 9 můžeme vidět základní způsoby štěpení (roubování): ablaktace, kopulace, na kozí nožku, do rozštěpu, za kůru, plátování, za kůru s klínovým řezem, očkování, očkování s obráceným T řezem, třískové očkování, nikolování, prstencové očkování, plátové očkování, lamelové štěpování, štěpování omega.



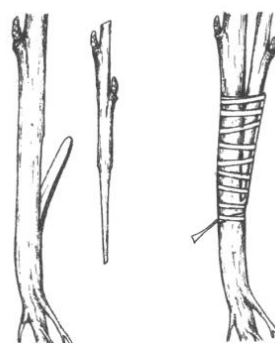
Obr. č. 4: kopulace družení, kopulace s jazýčkem (Bärtels, 1988)



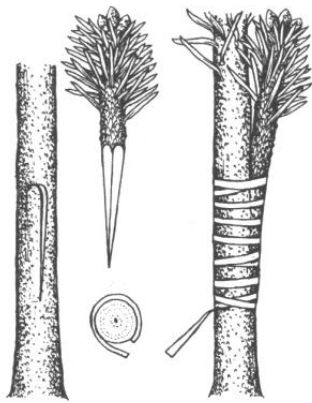
Obr. č. 5: roubování na kozí nožku tupým a ostrým roubem (Bärtels, 1988)



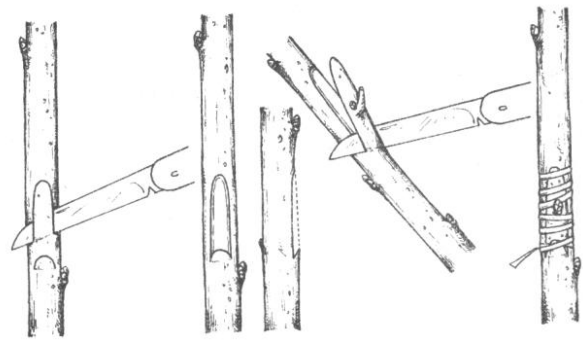
Obr. č. 6: roubování do rozštěpu normálním roubem a řezaným jako na kozí nožku (Bärtels, 1988)



Obr. č. 7: postranní plátkování (Bärtels, 1988)



Obr. č. 8: roubování za kůru s klínovým řezem (Bärtels, 1988)



Obr. č. 9: třískové očkování (Bärtels, 1988)

Paule (1992) metody vegetativního rozmnožování člení na tři základní skupiny

- autovegetativní rozmnožování
 - heterovegetativní rozmnožování
 - mikropropagace – kultury in vitro
-
- Autovegetativní rozmnožování

Z genetického hlediska je celá rostlina jedním genotypem. Jedinec může vznikat buď tvorbou kalusu, nebo z částí oddělených od mateřské rostliny. Podle tohoto rozeznáváme pět typů rozmnožování:

- a) listovými odřezky
- b) osovými odřezky
- c) kořenovými odřezky
- d) hřížením
- e) oddělováním

V praxi mají význam pouze první tři typy rozmnožování. Rozmnožování závisí na exogenních (vnějších) a endogenních (vnitřních) faktorech.

exogenní (vnější) faktory jsou: a) složení substrátu

- b) teplota a vlhkost substrátu
- c) fotoperioda a intenzita osvětlení
- d) chemické ošetření odřezků (růstové látky a fungicidy)

endogenní (vnitřní) faktory jsou: a) stupeň vývoje mateřské rostliny (ontogeneze)

b) typ odřezků (zdřevnatělé – zimní, nezdřevnatělé-letní)

c) fyziologický stav odřezků

d) předpřípravení odřezků nebo celých mateřských rostli
před odběrem odřezků

e) období odběrů odřezků

- Heterovegetativní rozmnožování

Jeden jedinec, který představuje dva odlišné genotypy – podnož a roub. Tyto dva genotypy se nikdy nespojí do jednoho genotypu. Nejčastější používané způsoby rozmnožování lesních dřevin jsou:

a) plátkování

b) za kůru

c) na kozí nožku

d) do boku

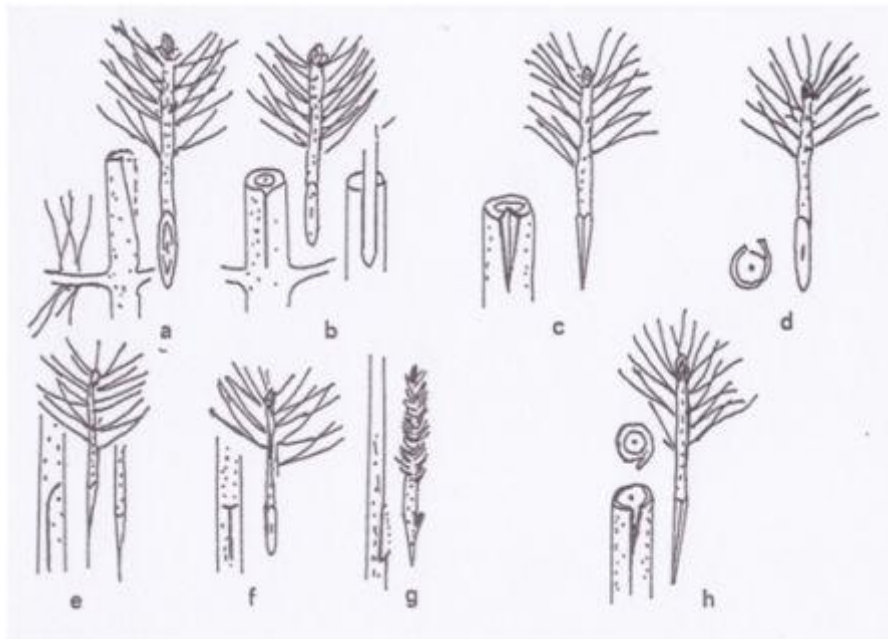
e) ve tvaru T

f) Prokazinova metoda

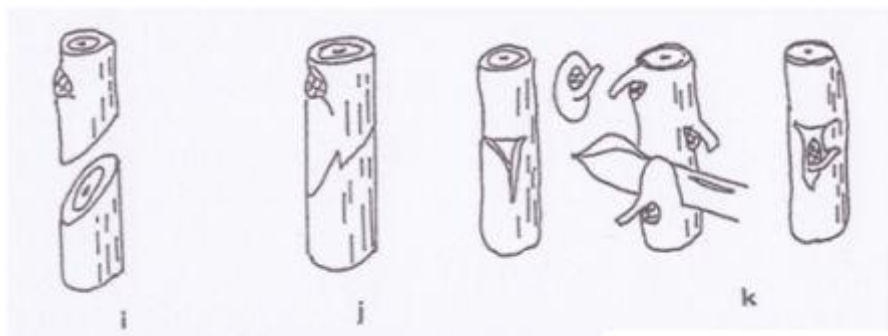
g) kopulace

h) anglická kopulace

ch) očkování



obr. č. 10. způsoby heterovegetativního rozmnožování: a – plátkování, b,d - za kůru, c - na koží nožku, e,h - do boku, f - ve tvaru T, g - Prokazinova metoda (Paule, 1992)



obr. č. 11. způsoby heterovegetativního rozmnožování: i – kopulace, j - anglická kopulace, k – očkování (Paule, 1992)

- Mikropropagace – kultury in vitro

Kultury in vitro zrychlují šlechtění lesních dřevin. Pomocí této metody pěstujeme explantáty (orgány, pletiva, buňkové suspenze) na živných médiích. Při dobrém růstu a vysokou fotosyntetickou aktivitou může při aplikaci in vitro snížit potřebný čas na produkci sadebního materiálu až o 75%. Touto metodou se budeme podrobněji zabývat v dalších kapitolách (Paule, 1992).

3. In vitro vegetativní množení rostlin

3. 1. Význam in vitro metody

In vitro je odborný termín, používaný v biologii a dalších příbuzných oborech pracujících s organizmy a jejich částmi v umělých podmínkách laboratoře. Úkolem metody in vitro je zlepšení genetických vlastností pěstovaného materiálu. Tato metoda umožňuje v krátkém časovém období na malém prostoru namnožit velké množství rostlin. Metoda spočívá v množení rostlin z nepatrných částí meristémových pletiv. Použití menších tkání rostlin (propagula), které nelze použít při klasickém vegetativním způsobu množení - tudíž rychlejší práce, lze s nimi manipulovat bez ohledu na časové období a prostoru za kontrolovatelných podmínek (Šebánek, Sladký, 1988)

Výhody a nevýhody metody in vitro uvádí (Kováč, 1995).

Výhody:

- Rozmnožování probíhá za sterilních podmínek v laboratořích
- Metodu in vitro lze provádět v jakémkoliv období, bez ohledu na klimatické podmínky
- Matečná rostlina se dá zachovat na živných médiích pro další použití
- Rychlost množení pomocí metody in vitro je vyšší než u tradičních metod
- Produkce klonů, jejichž množení tradičními metodami probíhá pomalu nebo vůbec
- zkrácení šlechtitelského cyklu
- malý rozměr řízku
- možnost použití netradičních orgánů

Nevýhody:

- relativně drahé vybavení laboratoří
- drahý ekonomický provoz laboratoře
- pracnost metody
- náročná aklimatizace rostlin na polní podmínky

3. 2. Historie

V roce 1756 Duhamel de Monceau popsal tvorbu kalusu na uměle poraněném kmeni jilmu (*Ulmus* sp.)

V roce 1878 Vochting sledoval tvorbu kalusu na částech rostlin v nesterilním prostředí (Procházka a kol., 1997).

Otcem této metody je profesor Steward, který provedl pokus se shlukem buněk mrkvového kořínku v nádobce s živným roztokem už v roce 1971. V zařízení, kde se pokusná nádobka neustále otáčela, podařilo se mu během 3 týdnů počet buněk rozmnožit na osminásobek. Následně se vytvořily i kořínky a po vysazení se podařilo vypěstovat celou mrkev. Výsledek tohoto pokusu se stal startem biotechnologické metody *in vitro* do dalších oborů pěstitelství – množení listnatých i jehličnatých stromů, okrasných dřevin pro zahradní architekturu apod.

Murashige a Skoog byli jedni z hlavních iniciátorů, kteří také vytvořili velmi úspěšné univerzální médium pro většinu rostlin, nazývané jako MS médium

V roce 1967 se v České republice začali provádět experimenty s rozmnožováním lesních dřevin metodou *in vitro*. V roce 1967 – 1973 byla založena první laboratoř, která je zaměřená na rozmnožování lesních dřevin metodou *in vitro*. Tato laboratoř se nachází v prostorách VÚLHM Jíloviště – Strnady. Zakladatelem této laboratoře byl prof. Ing. Vladimír Chalupa, DrSc. (<http://www.silvarium.cz/lesnicka-prace-c-11-00/rust-lesnich-stromu-vypestovanych-in-vitro-z-organovych-kultur-a-ze-somatickych-embryi>). V České republice se v dnešní době nacházejí dvě hlavní, konkurenční firmy pro pěstování sadebního materiálu metodou *in vitro*. Prvním pracovištěm je Školka Forest s.r.o. v Olešné. Hlavním programem této firmy je vegetativní množení dřevin a také genetické klonování metodou *in vitro*. (<http://www.skolka-forest.cz/hlavni-strana/>) A firma Holub Jan s.r.o. v Olomouci, která vyrábí sadební materiál pomocí mikropropagací. (<http://www.janholub.cz/>).

3. 3. Materiál a metody

3. 3. 1. Materiál pro založení explantátové kultury

Pro založení explantátové kultury používáme kořeny, listy, hypokotyl, meristémy, pupeny, nodální segmenty nebo embrya (Kamenická, Rypák, 1989). Mateční rostlina, z které jsou odebírány tyto explantáty, by měla být zcela zdravá (Kováč, 1995).

3. 3. 2. Ošetření po odběru materiálu

Jedna z nejdůležitějších částí množení metodou in vitro je sterilizace materiálu. Rostlinný materiál povrchově sterilizujeme například 0,1 – 0,2 % roztokem chloridu rtuťnatého (HgCl_2) po dobu 20 – 30 minut nebo 5 – 10% roztokem chloraminu po dobu 10 – 20 minut. Dále můžeme použít roztoky chlornanu sodného, peroxidu vodíku nebo bromidovou vodu.

Během sterilizace odebíraného materiálu by se měl pracovník laboratoře vyvarovat doteku sterilních rostlin holýma rukama. Během příslušných manipulací se musejí ruce udržovat v aseptickém stavu (vhodný postřík rukou, 40-70% ethanolem atd.) (Šebánek, Sladký, 1988).

3. 3. 3. Založení sterilní kultury

Z pupenů se vypreparují meristémová pletiva, obsahující celou genetickou informaci. Z nich se vypěstuje primární kultura. V reprodukční fázi se tento materiál namnoží do určitého množství. Vznikne jakýsi shluk rostlinek, které jsou posléze opět ve sterilním prostředí rozřezány na mikrořízky. Menší část slouží k zachování primární kultury a k dalšímu množení, větší část se nechá zakořenit ve speciálním médiu (Šebánek, Sladký, 1988).

3. 3. 4. Živná média

Důležitou složkou média jsou minerální živiny, to jsou makroprvky, mikroprvky a organické látky, sacharidy (cukry), jako zdroj energie a uhlíku. Důležitý faktor ovlivňující osmotickou hodnotu media, vitaminy, aminokyseliny a další specifické organické látky. Tyto složky živného media se navzájem ovlivňují. Používají se tekutá média ale i ztužená (Procházka a kolektiv, 1997).

Jedinci se pěstují na těchto médiích: MS médium (Murashing a Skoog, 1962). Jeho složení je popsáno v příloze č. 1. Vhodné médium pro listnaté i jehličnaté dřeviny, patří mezi základní média., SH médium (Schenk a Hildebrand, 1972). Jeho složení je popsáno v příloze č. 2. Vhodné médium pro jehličnaté dřeviny., QL médium (Quoirin a Lepoivre, 1977), WPM médium (LLoyd a McCown, 1980), jeho složení je popsáno v příloze č. 3. Vhodné médium pro listnaté i jehličnaté dřeviny., BTM médium (Chalupa, 1981) jeho složení je popsáno v příloze č. 4. Vhodné médium pro listnaté dřeviny., a LM médium (Litvaya a kol. 1981) jeho složení je popsáno v příloze č. 5. Toto médium je vhodné pro jehličnaté dřeviny.

3.3.4.1. Růstové regulátory

Růstové regulátory rostlin řídí nebo upravuje růstové procesy rostlin, aniž by rostliny poškozovaly. Mezi růstové regulátory patří: auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a etylén.

Auxiny

Název pochází z řeckého auxein a znamená růst. Auxiny, jsou významná skupina růstových hormonů podporují prodlužování buněk, způsobují apikální dominanci, stimulují vývoj cévních svazků, růst kořene, skládání adventivních kořenů. Auxin je syntetizován rovněž v malých listech, květních orgánech a vyvíjejících se plodech, zejména v semenech. V poslední době byly v rostlinách nalezeny kyseliny indolyl-3-máselná (IBA) a kyselina 4-chlor - IAA, dříve považované za látky syntetické. Dalším přirozeným auxinem je kyselina fenylactová (PAA) (Luštinec, Žárský, 2005).

Cytokininy

Cytokinin stimuluje buněčné dělení, potlačení apikální dominance, iniciace adventivních pupenů. První přirozený (endogenní) cytokinin byl nalezen v nezralém endospermu kukuřice a byl nazván zeatin. V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů (Šebánek, Sladký, 1988). V kulturách *in vitro* byl jako cytokinin nejčastěji používán spolu s kinetinem 6 - benzyladenin (BA) neboli 6 - benzylaminopurin (BAP). Hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou kořeny, odkud jsou cytokininy transportovány do nadzemní části xylémem (Procházka a kol, 1997).

Gibereliny

Giberelin způsobuje porušení dormance pupenů nebo semen, mobilizace zásobních látek v semenech při klíčení, indukce klíčení semen, indukce kvetení, prodlužování internodií spojené se stimulací růstu (Šebánek, Sladký, 1988). Nejpoužívanější Giberlin je GA₃. Giberliny podporují růst kalusu a prodlužují růst nadzemní části rostlin (Razdan, 2003).

Kyselina abscisová

Kyselina abscisová je hlavním faktorem při přizpůsobení rostlin na stres, má vliv na kontrolu zavírání průduchu při vodním stresu, tlumí působení ostatních růstových podporujících fytohormonů (Šebánek, Sladký, 1988).

Etylén

Etylén zvyšuje sílení stonku a kořenů, zvyšuje horizontální růst, vyvolává tvorbu adventivních kořenů a odlučovací vrstvy v řapících listů a plodů (Šebánek, Sladký, 1988).

3. 3. 4. 2. Ostatní látky obsažené v médiích

Minerální soli

Jsou to minerální živiny, které rostliny potřebují k životu především makrobiogenní prvky N, P, K, Ca, S a Mg v mM množství a mikrobiogenní prvky Mn, Zn, B, Cu a Fe (Šebánek, Sladký, 1988). Z důvodů různých nároků rostlin na výživu se liší obsah makrobiogenní a mikrobiogenních látek v médiích. (George a kol., 2008).

Uhlík (sacharidy)

Jako zdroj energie v živných médiích se především užívá sacharosy nebo glukosy a méně fruktosa (Šebánek, Sladký, 1988).

Vitamíny

Nezbytný vitamín je thiamin. Pro lepší růst lze použít i kyselina nikotinová a pyridoxin. Do některých médií se přidává kyselina panatobenová a biotin, ale tyto vitamíny nejsou nutné. V malém množství se mohou přidávat i kyseliny p-aminobenzoová, askorbová, cholinchlorid, riboflavin a další. (Šebánek, Sladký, 1988).

3. 3. 4. 3. Fyzikální podmínky pěstování

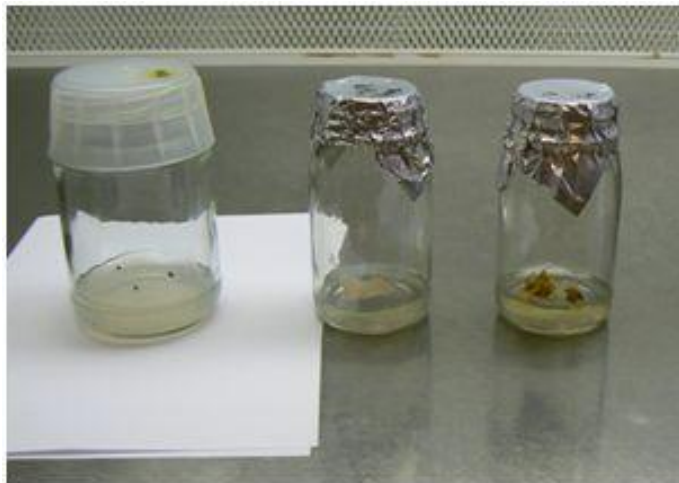
Fyzikální faktory ovlivňující metodu in vitro jsou teplota, osvětlení, vlhkost vzduchu, a výměna plynů.

Teplota by měla být okolo 20 – 25°C (Paule, 1992). Ze začátku množení by teplota měla být nižší. Nižší teplota zvyšuje životaschopnost explantátů a snižuje tvorbu plísní a bakterií. Dalším faktorem je osvětlení. Doporučená doba osvětlení je 8 – 10 hodin. Nesprávné osvětlení negativně ovlivňuje explantáty (Kamenická, Rypák, 1989). Další faktor je vlhkost vzduchu. Explantáty jsou pěstovány v uzavřených nádobkách, ve kterých je vzdušná vlhkost blízka 100%. Dalším faktorem je množství živného média. Při větším objemu živného média se lépe tvoří nové kořeny, většinou do 100 ml baňky se dává 20 ml živného média (Paule, 1992).

3. 3. 5. Průběh růstu kultur

3. 3. 5. 1. Růst explantátů

Po založení explantátové kultury z pupenů dospělých stromů, byly tyto explantáty umístěny na živné médium. Na explantátech odebrané z pupenů se po 3 – 4 týdnech začaly tvořit nové výhonky. Okolo 7. týdne byly zpozorovány nové rostoucí prýty. Poté, byly explantáty přesazeny do nového média a po dalších 6 týdnech opět vyrůstají další prýty. Po zaplnění celé nádoby z mikroventylací se explantáty opět přesazují (rozdělují se do dalších, nádob). Na obrázku číslo. 12 a 13 vidíme růst explantátů mezi 3 až 16 týdnem.



Obr. č. 12: růst explantátu ve 3 – 4 týdnu



Obr. č. 13: růst explantátu v 15 - 16 týdnu

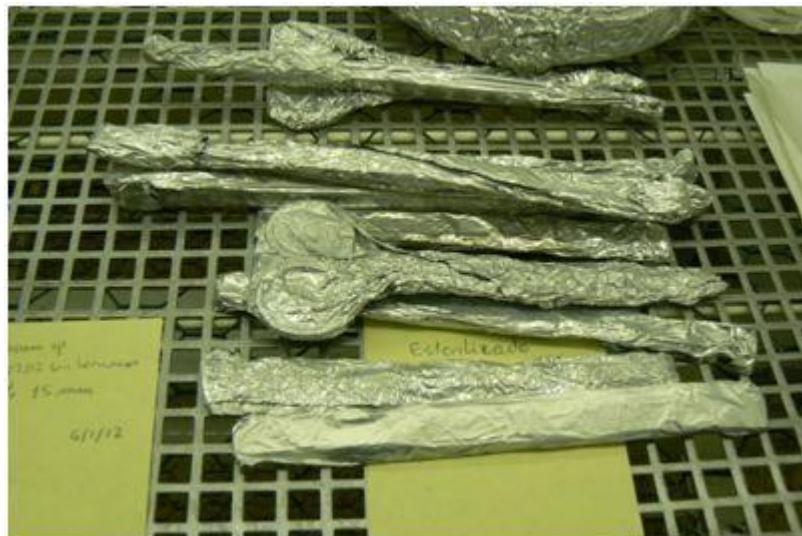
3. 3. 5. 2. Přesazování rostlin (explantátů)

Pro přesazování rostlin, které jsou množeny metodou *in vitro*, musíme mít sterilní prostředí. Muže to být speciální místnost vhodná pro přesazování rostlin. V této místnosti je světlo a teplo přizpůsobené k množení, nebo přesazování provádíme v kultivačním boxu. V našem případě byl použit flow – box, který vidíme na obrázku číslo 14. Tento flow-box je umístěn ve speciální místnosti v laboratoři.



Obr. č. 14: flow – box se sterilním nářadím připravené na přesazování

Před začátkem přesazování byl flow – box ošetřen. Pro ošetření a sterilizaci flow - boxu byl celý povrch otřen čistícími prostředky, například: 80% lihem, savem, popřípadě domestosem, aby byly zahubeny všechny bakterie. Pro udržení sterilního prostředí musela být zapnuta cirkulace vzduchu. Tato cirkulace udržuje prostor flow – boxu chráněný před bakteriemi a případně se tvořícími plísněmi. Pro správné a sterilní přesazování muselo být použito sterilní nářadí viz obrázek číslo 15, které bylo přinesené a pečlivě zabalené ve sterilním alobalu ze speciální místnosti. Nástroje byly sterilizovány v parním sterilizátoru. Pro přesazování bylo připraveno nářadí: kahan, sterilní nůžky, pinzeta a baňky s plastovým víčkem s mikroventilací, kam byly rostlinky rozsazovány.



Obr. č. 15: sterilní nástroje připravené pro přesazování

Když bylo vše sterilizováno, bylo možno začít přesazovat. Byla připravena sklenička s přesazovanou rostlinkou. Baňka byla opatrně otevřena a horní kraj lehce opálen nad kahanem, aby byly zničeny případné bakterie. Totéž bylo uděláno i s prázdnou baňku, která byla připravena pro odebrané odnože. Pinzety a nůžky byly vybaleny a také opáleny nad ohněm. Postupně byly odebírány odnože pro přesazení. Odnož byla uchopena do pinzet a odstříhnutá. Odstříhnuty byly přebytečné, delší listy. Opatrně byly asi dva cm hluboko zapíchnuty do nové baňky, aby se mohly dobře tvořit kořeny. Do jedné baňky bylo takto umístěno 5 - 6 prýtů odnoží. Když byla baňka hotová, opět byl opálen i horní okraj a dobře uzavřen víčkem s mikroventilací. Obr. č. 16. Z jedné takto připravené baňky můžeme přesadit až 10 nových baněk s 5 - 6 odnožemi.



Obr. č. 16: a) jedinec připravený na přesazení, b) baňka pro přesazení a c) přesazené prýty odnože



Obr. č. 17: námi přesazené prýty odnože

Po uchycení se zakořeněné prýty odnože opatrně vyndají ze skleničky a rozdělí se na jednotlivé odnože. Očistí se od živného média, ve kterém byly umístěny a sázejí se do substrátu. Složení substrátu je rašelina, perlit a písek v poměru 2:1:1. Do jednotlivých nádob na přesazení (kelímku, sadbovačů) se na dno nasype cca 2 cm písku pro lepší protékání vody. Přidá se námi připravený substrát a odnož se zasadí. Substrát byl umáčknut a zalit. Takto naplněné sadbovače se umístí do skleníku nebo mikroskleníků.



Obr. č. 18: explantáty vyndané z baňky v živném médiu (Kostková, 2010)



Obr. č. 19: kořenící explantáty



Obr. č. 20: rostoucí sazenice, otužené
rostoucí v nesterilních
podmínkách



Obr. č. 21: zakořeněné rostlinky v
nestabilním prostředí
miniskleníku

4. Výsledky

4. 1. Výroba živného média s názvem,, MS ,(Murashige a Skoog, 1962)

Pro tuto práci bylo připraveno MS médium (Murashige a Skoog, 1962)

Příprava média: 1. Vlastní příprava dle návodu.

2. Využití předpřipraveného média (SIGMA)

1. Vlastní příprava dle návodu

Médium je roztok anorganických a organických sloučenin. Postup výroby živného média o objemu jednoho litru: nejprve si připravíme nádobu ve, které vše budeme míchat,, odměrný válec,, o větším objemu asi tak na tři litry z důvodu pozdějšího míchání, zahřívání atd. Do odměrného válce postupně přidáváme KN0_3 , NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ za pomoci menšího odměrného válce s měřicí stupnicí v určitém množství viz tabulka číslo 1.

Název	Vzorec	Množství [mg.l ⁻¹]
Dusičnan draselný	KN0_3	1900 mg/l
Dusičnan amonný	NH_4NO_3	1650 mg/l
Chlorid vápenatý dihydrát	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/l
Síran hořečnatý heptahydrát	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/l
Hydrogen fosforečnan draselný	KH_2PO_4	170 mg/l
Solná sůl etylén diamin tetraoctové kyseliny	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3 mg/l
Sulfid železnatý heptahydrát	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg/l

Tab. č. 1: anorganické a organické sloučeniny potřebné pro výrobu média MS

Směs promícháme a dále přidáváme H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ za pomoci pipety každý prvek přidáváme zvlášť s novým zobáčkem. Na pipetě nastavíme množství, které chceme, aby nasála. Na konec pipety nasadíme zobáček, stlačíme jeden konec pipety a druhý ponoříme a nasajeme. Poté obsah prvku v pipetě přeneseme do odměrného válce. Na obrázku číslo 22, vidíme stojan s několika pipetami. Pipeta má dvě polohy první vytlačí prvek ze zobáčku a druhá odstraní zbytky látky. Množství přidávaných látek je uvedené v tabulce číslo 2.



Obr. č. 22 pipety

Název	Vzorec	Množství [mg.l ⁻¹]
Kyselina boritá	H ₃ BO ₃	6,2 mg/l
Síran manganatý tetra hydrát	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg/l
Tetrahydrát síranu zinečnatého	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6 mg/l
Jodid draselný	KI	0,8 mg/l
Molybdenan sodný	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/l
Síran měďnatý penta hydrát	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 mg/l
Chlorid kobaltnatý hexahdrát	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 mg/l

Tab. č. 2: další anorganické a organické sloučeniny potřebné pro výrobu média MS

Dále do odměrného válce přidáváme organická aditiva, viz tabulka číslo 3.

Název	Množství [mg.l ⁻¹]
Thiamine HCl	1,0 mg/l
Nicotinic acid	0,5 mg/l
Pyridoxine HCl	0,5 mg/l

Tab. č. 3: organické látky přidávané do MS média

Po kompletaci anorganických složek jsou přidány organické složky média. Všechny ty to prvky jsou v kapalném stavu a musejí se uchovávat v chladničce. Příprava tohoto materiálu trvá přibližně 30 minut. Dále se přidávají prvky v práškovém stavu a to Myo-Inositol, vitamíny, glutamín, sůl a nějaký zdroj uhlíku, v našem případě sacharosu. Množství těchto látek je uveden v tabulce číslo 4.

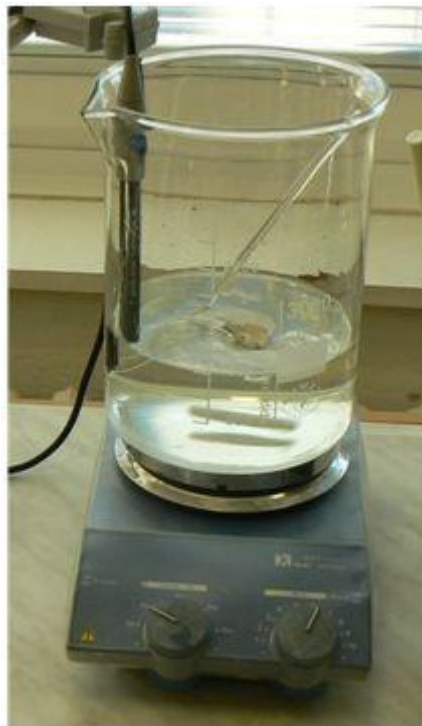
Název	Množství [mg.l ⁻¹]
Myo-Inositol	100 mg/l
vitamíny	100 mg/l
glutamín	200 mg/l
sůl	200 mg/l
sacharóza	30 g/l

Tab. č. 4: organické složky přidávané do MS média

Námi připravený roztok musíme velice dobře promíchat, aby se vše dobře rozpustilo. Zkontrolujeme roztok a změříme. V případě, že máme roztoku méně, dolijeme vodou do jednoho litru. A dáme na míchačku, viz obrázek číslo 23, aby se vše lépe rozpustilo. Pro každou fázi mikropropagace se přidávají různé koncentrace rostlinných regulátorů růstu (fytohormonů). Pro fázi množení prýtu přidáváme BAP v kombinaci s IBA a pro zakořenění prýtlů IBA, nebo IBA v kombinaci s NAA. BAP v koncentraci 1,8mg/l, Iba 2 mg/l. atd. Množství těchto látek je uvedeno v tabulce číslo 5.

Název	Vzorec	Množství [mg.l ⁻¹]
Benzylaminopurin	BAP	1,8 mg/l
Indol – 3 másečná kyselina	IBA	2 mg/l

Tab. č. 5: regulátory růstu pro jednotlivé fáze množení



Obr. č. 23: míchačka

Po doplnění hormonů a dolití destilované vody do požadovaného objemu bylo změřeno a podle potřeby upraveno pH na hodnotu 5,7. Úprava pH probíhá přidáváním KOH nebo kyselinou askorbovou. Na obrázku číslo 24 můžeme vidět míchačku s přístrojem na měření pH.



Obr. č. 24: míchačka na pravé straně s přístrojem na měření pH na levé straně

Po dokončení měření PH rameno vyjmeme a opláchneme. Po sejmutí z míchačky opět zkontrolujeme množství roztoku. Pokud máme roztoku méně, než jeden litr opět doplníme vodou. Tento proces trvá přibližně dalších deset minut.

Pro ztužení živného média byl přidán agar v koncentraci 6,5g/l. Připravený roztok byl ohřát nad 60°C aby došlo k rozpuštění agaru.

Pro námi namíchané živné medium použijeme baňky o velikosti 150 – 200ml s uzavíratelným plastovým víčkem s mikroventilací. Nové skleničky by se kvůli bakteriím a případným nečistotám měli vyvařit na 150° C po dobu tří hodin.

Přenesení živného média do připravených baňek, by mělo být rychlé z důvodu tuhnutí média. Naléváme ručně nebo ve velkých organizacích používají dávkovače. Médium s rozpuštěným agarem se postupně rozlije po 20- 30 ml. Rozlití trvá přibližně pět minut. Po přemístění živného média musíme baňky dobře uzavřít plastovým víčkem s mikroventilací. Uzavírání trvá přibližně pět minut. Jeden litr živného média se přibližně vejde do 22 baněk. Baňky s nalitým živným médiem zachycuje obrázek číslo 25.



Obr. č. 25: baňky s živným médiem

Baňky naplněné médiem se po dobu 20 minut umístí do parního sterilizátoru o teplotě 121°C. Obrázek číslo 26 zachycuje baňky připravené na sterilizaci. Po sterilizaci jsou baňky vyndány ze sterilizátoru a ponechány postupnému samostatnému chladnutí při pokojové teplotě viz obrázek číslo 27. Tím dojde k ztužení média.



Obr. č. 26: baňky s živným médiem připravené na autoklavování



Obr. č. 27: přístroj na autoklavování

Již hotové médium můžeme začít používat za dva až tři dny. Během těchto dnů se ukáže, zda-li je živné médium vhodné na další použití. Muže se stát, že je poškozené, napadené plísní, nějakým parazitem, nebo se v baňce vyskytla nečistota, která médium poškodila. Obrázek číslo 28 zachycuje živné médium, které se bude dále používat pro rozmnožování a obrázek číslo 29 zachycuje kontaminované médium, které se již nedá použít.



Obr. č. 28: živné médium, které se bude dále používat



Obr. č. 29: poškozené živné médium

V tabulce číslo 6 je shrnutí časové náročnosti výroby média.

Příprava média	Čas
Namíchání prvků	30 minut
Míchání živného média	10 minut
Rozpouštění Agarů	15 minut
Rozlití do skleniček	5 minut
Uzavření skleniček	5 minut
Autoklavování	20 minut
Chladnutí	20 minut
Součet	105 minut

Tab. č. 6: časové shrnutí výroby živného média

2. Využití předpřipraveného média (SIGMA)

Do připravené směsi organických a anorganických látek pouze přidáme vodu. Sáček je připraven na jeden litr živného média. Obrázek číslo 30 zachycuje sáček SIGMA.



Obr. č. 30: sáček SIGMA

5. Shrnutí získaných dat

V kapitole výsledky byla popsána výroba živného média. Zde jsou popisovány dvě možnosti dvě možnosti výroby média, výroba ze sáčku SIGMA, nebo vlastním namícháním. Vlastní výroba je časově náročnější na výrobu. Vlastní namíchání trvalo 105 minut. Namíchání ze sáčku trvalo přibližně 20 minut. V další kapitole jsou tyto možnosti množení zhodnoceny i ekonomicky.

6. Ekonomické zhodnocení

Tato část je věnována ekonomickému porovnání klasického rozmnožování a množení metodou in vitro. V první části se zabývá metodou in vitro a náklady na výrobu živného média. Výroba tohoto média s názvem MS médium je popsána již dříve v kapitole výsledky. V příloze číslo 1 je uvedeno složení tohoto média s názvy, vzorci a množství uvedené na jeden litr. Výpočet je proveden na 1000 litrů živného média a přepočítán na výrobu 1 litru. Uvedené sloučeniny se totiž nedají zakoupit v množství, které je třeba na výrobu 1 litru, nakupují se zpravidla velká balení.

Název	Vzorec	Množství na 1000 l	Cena
Dusičnan draselný	KNO_3	1900000 mg -1900 g	272,33,-
Dusičnan amonný	NH_4NO_3	1650000 mg -1650 g	386,10,-
Chlorid vápenatý dihydrát	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440000 mg -440 g	699,77,-
Síran hořečnatý heptahydrát	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370000 mg -370 g	98,09,-
Hydrogen fosforečnan draselný	KH_2PO_4	170000 mg -170 g	54,92,-
Solná sůl etyléndiamin tetraoctové kys.	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37300 mg -37,3 g	746,25,-
Sulfid železnatý heptahydrát	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28700 mg -27,8 g	17,29,-
Kyselina boritá	H_3BO_3	6200 mg -6,2 g	354,36,-
Síran manganatý tetra hydrát	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22300 mg -22,3 g	11,83,-
Síran zinečnatý	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8600 mg -8,6 g	1030,08,-
Jodid draselný	KI	800 mg -0,8 g	109,73,-
Molybdenan sodný	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250 mg -0,25g	0,49,-
Síran měďnatý penta hydrát	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20 mg -0,02g	0,0083,-

Chlorid kobaltnatý hexahydrát	CoCl ₂ .6H ₂ O	20 mg -0,02g	0,031,-
Thiamine HCl		1000 mg -1g	0,71,-
Nicotinic acid		500 mg -0,5 g	38,02,-
Pyridoxine HCl		500 mg -0,5 g	51,25,-
Glycín		2000 mg -2 g	42,06,-
Sacharóza		30000 mg -30 g	745,5,-
Cena celkem na 1000 litrů			4 658,82,-
Cena celkem na 1 litr			4658,82 : 1000 4,66,-

Tab. č. 7: shrnutí cen za jednotlivé prvky při výrobě MS média

Toto médium o množství 1000 litru bylo spočítáno na Kč 4 658,82,-. Tedy po přepočtu na 1 litr Kč 4,66,-. Živné médium si můžeme vytvořit i jednodušeji a to jen ze sáčku SIGMA. Tento sáček stojí přibližně Kč 32,50,-. V tabulce číslo 8 uvádím celkové ceny média. V ceně médií jsou započítány i průměrné mzdové náklady, které činily Kč 120,00,-/ 1hod. Námi namíchané médium trvalo 105 minut, viz tabulka číslo 6, kapitola 4. 1. Výroba živného média s názvem „MS „ (Murashige a Skoog, 1962). Namíchání sáčku Sigma trvalo 20 minut. V prvním sloupečku je námi namíchané médium a v druhém je médium namíchané ze sáčku SIGMA. Z tabulky vidíme, že námi namíchané médium je dražší než ze sáčku SIGMA. Z důvodu časové náročnosti na přípravu.

Námi namíchané médium	Sáček SIGMA
214,66,- Kč	72,50,-Kč

Tab. č. 8: cenové shrnutí živného média

Dále budeme porovnávat sazenice vypěstované metodou in vitro a klasickou metodou pěstování dřevin. V tabulce číslo 9 jsou uvedeny ceny dřevin z lesní školky Svinošice vypěstované klasickými metodami. Ceny jsou uvedeny bez DPH.

Název	Výška	Ks	Ks	Ks
		1 – 24 ks	25 – 99 ks	100 – 999 ks
Smrk	12 – 25 cm výšky	7,70	6,30	5,40
Jedle	12 – 25 cm výšky	13,00	11,00	9,00
Borovice	12 – 25 cm výšky	6,20	4,90	3,90
Dub	25 – 35 cm výšky	10,20	8,30	6,80
Buk	25 – 35 cm výšky	9,50	8,00	6,70
Lípa	25 – 35 cm výšky	12,50	9,90	8,50

Tab. č. 9: ceny dřevin vypěstovaných klasickými metodami

V tabulce číslo 10 jsou uvedeny dřeviny ze školky - Forest v Olešné vypěstované metodou in vitro. Sazenice jsou opět bez DPH.

Název	Výška	Ks	Ks	Ks
		1 – 24 ks	25 – 99 ks	100 – 999 ks
Smrk	12 – 25 cm výšky	12,30	11,20	9,60
Jedle	12 – 25 cm výšky	17,20	16,40	14,20
Borovice	12 – 25 cm výšky	8,30	6,20	5,80
Dub	25 – 35 cm výšky	13,20	11,20	8,70
Buk	25 – 35 cm výšky	12,60	10,20	8,60
Lípa	25 – 35 cm výšky	11,60	10,80	9,60

Tab. č. 10: ceny dřevin vypěstovaných metodou in vitro

Při pohledu na tabulku číslo 9 a číslo 10 vidíme, že dřeviny vypěstované metodou in vitro jsou o něco dražší. Z důvodů nákladu na výrobu živného media a času na pěstování dřevin metodou in vitro. V ceně se také odráží náročnost metody, vybavení potřebné k výrobě a ohodnocení odborných pracovníků.

7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala klasickými metodami rozmnožování lesních dřevin. Především jsem se zaměřila na metodu in vitro. Tato metoda je důkladně popsána v několika kapitolách. V kapitole výsledky je popsán růst explantátů a výroba živného média. Na závěr bylo vytvořeno a sepsáno ekonomické porovnání klasických metod a metody in vitro. Bylo zjištěno, že se rozmnožování dřevin metodou in vitro pro jednotlivého pěstitele nevyplatí. Náklady na výrobu jedné sazeničky jsou příliš vysoké v porovnání se sazenicemi vypěstovanými klasickými metodami. Vzhledem ke skutečnosti, že tato metoda je pro jedince cenově náročná, využívá se tedy tato metoda především ve velkých podnicích. V České republice se této problematice věnuje pracoviště školka - Forest v Olešné a Jan Holub, s.r.o. v Olomouci.

8. Seznam použité literatury

- Bärtels A., 1988: Rozmnožování dřevin. Státní zemědělské nakladatelství Praha: 451 s.
- Georgie E. F., Hall M. A., De Klerk G. J., 2008: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer: 508 s.
- Chalupa V., 1981: Clonal propagation of broad-leaved forest trees in vitro. *Communicationes Instituti Forestalis Čechosloveniae* 12:255-271.
- Chalupa V., 1990: Vegetativní rozmnožování dubu (*Quercus robur*) buku (*Fagus sylvatica*) a lípy (*Titia cordata*) řízkami a exponátovými kulturami. *Lesnictví* 36:589-598.
- Kamenická A., Rypák M., 1989: Explantáty v rozmnožování dřevin . Veda vydavateľstvo Slovenskej akademie vied Bratislava: 158 s.
- Kováč J., 1995: Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého – Přírodovědná fakulta: 142 s.
- Kováčik A., a kolektiv, 1983: Genetika rostlin. Státní zemědělské nakladatelství Praha: 488 s.
- Litvaya I. D., Johnson M. A., Verma D., Einspahr D., Weyranch K., 1981: Conifer suspension culture medium developmen using analytical data rom developing seeds. Institute of Paper Chemistery, Appleton, WI., Technical Paper 115.

- LLoyd G., McCown, B., 1981: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagation Society* 30:421-427.
- Luštinec J., Žárský V., 2005: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Nakladatelství Karolinum Praha: 261 s.
- Murashige T., Skoog, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Paule L., 1992: genetika a šľachtenie lesných drevin. Vydala PŘÍRODA a.s. Bratislava: 304 s.
- Procházka S., Šebánek J., Macháčková I., Krekule J., Kamínek M., Borkovec V., Hradilík J., Havel L., Omdrej M., Psota V., Luxová M., Rauscherová L., Sladký Z., Vizárová G., Čížková R., Klíčová Š., Rozkošová V., 1997: Regulátory rostlinného růstu. Academia Praha: 394 s.
- Razdan M. K., 2003: Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers: 375 s.
- Schenk V. P., Hildebrandt, A. C., 1972: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledons and dicotyledons plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204
- Šebánek J., Sladký Z., 1988: Biotechnologie rostlinných explantátů. Vysoká škola zemědělská Brno: 100 s.

Internetové odkazy

- <http://www.skolka-forest.cz/laborator-in-vitro/co-je-in-vitro/>
- http://www.lesymb.cz/obj/109/Cenik_lesni_sazenice.pdf
- <http://www.janholub.cz/>
- <http://www.silvarium.cz/lesnicka-prace-c-11-00/rust-lesnich-stromu-vypestovanych-in-vitro-z-organovych-kultur-a-ze-somatickych-embryi>

9. Seznam obrázků

Obrázek číslo 1. - Srůstové pochody při srůstání podnože a roubu A-první kontakty mezi podnožím a roubem (Bärtels, 1988)	str. 14
Obrázek číslo 2. - Srůstové pochody při srůstání podnože a roubu B- vývojový stav ve druhém úseku srůstání (Bärtels, 1988)	str. 15
Obrázek číslo 3. - Srůstové pochody při srůstání podnože a roubu C-stav krátce před úplným srůstem (Bärtels, 1988)	str. 16
Obrázek číslo 4. - Kopulace družení, kopulace s jazýčkem (Bärtels, 1988)	str. 17
Obrázek číslo 5. - Roubování na kozí nožku tupým a ostrým roubem (Bärtels, 1988).....	str. 17
Obrázek číslo 6. - Roubování do rozštěpu normálním roubem a řezaným jako na kozí nožku (Bärtels, 1988).....	str. 17
Obrázek číslo 7. - Postranní plátkování (Bärtels, 1988).....	str. 17
Obrázek číslo 8. - Roubování za kůru s klínovým řezem (Bärtels, 1988).....	str. 18
Obrázek číslo 9. - Třískové očkování (Bärtels, 1988).....	str. 18
Obrázek číslo 10. - Způsoby heterovegetativního rozmnožování (Paules, 1992).....	str. 21
Obrázek číslo 11. - Způsoby heterovegetativního rozmnožování (Paules, 1992)	str. 21
Obrázek číslo 12. - Růst explantátu ve 3 – 4 týdnu (Lenka Laštovková, 2011).....	str. 32
Obrázek číslo 13. - Růst explantátu v 15 - 16 týdnu (Lenka Laštovková, 2011).....	str. 33
Obrázek číslo 14. - Flow – box se sterilním náradím připravené na přesazování (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 34
Obrázek číslo 15. - Sterilní nástroje připravené pro přesazování (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 35
Obrázek číslo 16. - a) Jedinec připravený na přesazení, b) sklenička pro přesazení a c) přesazené prýty odnože (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 36
Obrázek číslo 17. - Námi přesazené prýty odnože (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 37
Obrázek číslo 18. - Explantáty vyndané ze skleničky v živném médiu (Kostková, 2010).....	str. 37
Obrázek číslo 19. - Koření explantáty (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 38

Obrázek číslo 20. - Rostoucí sazenice, otužené a rostoucí v nesterilních podmínkách (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 38
Obrázek číslo 21. - Zakořeněné rostlinky v nestabilním prostředí miniskleníku (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 38
Obrázek číslo 22. - Pipety (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 40
Obrázek číslo 23. - Míchačka (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 43
Obrázek číslo 24. - Míchačka na pravé straně s přístrojem na měření PH na levé straně (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 44
Obrázek číslo 25. - Skleničky s živným médiem (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 45
Obrázek číslo 26. - Skleničky s živným médiem připravené na autoklavování (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 46
Obrázek číslo 27. - Přístroj na autoklavování (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 46
Obrázek číslo 28. - Živné médium, které se bude dále používat (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 47
Obrázek číslo 29. - Poškozené živné médium (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 48
Obrázek číslo 30. - Sáček SIGMA (Lenka Laštovková, 2012).....	str. 49

Obrázky

Kostková O., 2010: Fytoremediace – využití dřevin hyperakumulujících těžké kovy z kontaminovaných půd, Diplomová práce, ČZU, fakulta lesnická a dřevařská

10.Přílohy

Příloha č. 1: Složení MS média

Příloha č. 2: Složení SH média

Příloha č. 3: Složení WPM média

Příloha č. 4: Složení BTM média

Příloha č. 5: Složení LM média

Příloha č. 1

NH_4NO_3	1650 mg.l^{-1}
KNO_3	1900 mg.l^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg.l^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg.l^{-1}
KH_2PO_4	170 mg.l^{-1}
H_3BO_4	$6,2 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$22,3 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0,025 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0,025 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$8,6 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ mg.l}^{-1}$
KI	$0,83 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$27,8 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$37,3 \text{ mg.l}^{-1}$
Thiamin - HCl	$0,1 \text{ mg.l}^{-1}$
Pyridoxin - HCl	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Kyselina Nikotinová	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Glycín	2 mg.l^{-1}
Sacharóza	30000 mg.l^{-1}
pH 5,6 – 5,8	

Složení MS média (Murashing a Skoog, 1962)

Příloha č. 2

KNO ₃	2500 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	400 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	200 mg.l ⁻¹
NH ₄ H ₂ PO ₄	300 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	10 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	5 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1 mg.l ⁻¹
KI	1 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,2 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,1 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,1 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	15 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	20 mg.l ⁻¹
Thiamin - HCl	5 mg.l ⁻¹
Pyridoxin - HCl	0,5 mg.l ⁻¹
Kyselina Nikotinová	0,5 mg.l ⁻¹
Sacharóza	30000 mg.l ⁻¹
pH 5,9	

Složení SH média (Schenk a Hildebrand, 1972)

Příloha č. 3

NH_4NO_3	400 mg.l^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96 mg.l^{-1}
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556 mg.l^{-1}
K_2SO_4	990 mg.l^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg.l^{-1}
KH_2PO_4	170 mg.l^{-1}
Na_2EDTA	$37,3 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$27,8 \text{ mg.l}^{-1}$
H_3BO_3	$6,2 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$22,3 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$8,6 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ mg.l}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ mg.l}^{-1}$
Myo - Inositol	100 mg.l^{-1}
Thiamin - HCl	1 mg.l^{-1}
Kyselina Nikotinová	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Pyridoxin - HCl	$0,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Glycín	2 mg.l^{-1}
Sacharóza	20 g.l^{-1}
Agar	6 g.l^{-1}

Složení WPM média (LLoyd a McCown, 1980)

Příloha č. 4

KNO ₃	190 mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	165 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	44 mg.l ⁻¹
Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	640 mg.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	240 mg.l ⁻¹
K ₂ SO ₄	860 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	170 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,3 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,2 mg.l ⁻¹
Sacharóza	20000 mg.l ⁻¹
BAP	0,2 - 1mg.l ⁻¹
IBA	0,1 – 0,3 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6 mg.l ⁻¹
KI	0,15 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,02 mg.l ⁻¹
Myo - Inositol	100 mg.l ⁻¹
Thiamin - HCl	1 mg.l ⁻¹
Kyselina Nikotinová	0,5 mg.l ⁻¹
Pyridoxin - HCl	0,5 mg.l ⁻¹
Glycín	2 mg.l ⁻¹
Glutamín	2 mg.l ⁻¹

Složení BTM média (Chalupa, 1981)

Příloha č. 5

KNO ₃	1900 mg.l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	22 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1850 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	340 mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA	37,3 mg.l ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 mg.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	31 mg.l ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	21 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	43 mg.l ⁻¹
KI	4,15 mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,25 mg.l ⁻¹
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,5 mg.l ⁻¹
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,13 mg.l ⁻¹
Myo - Inositol	100 mg.l ⁻¹
Thiamin - HCl	0,1 mg.l ⁻¹
Kyselina Nikotinová	0,1 mg.l ⁻¹
Pyridoxin - HCl	0,1 mg.l ⁻¹
Glutamín	500 mg.l ⁻¹
Sacharóza	20 g.l ⁻¹
Agar	6 g.l ⁻¹

Složení LM média (Litvaya a kol., 1981)