

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa



Bakalářská práce

***In vitro* rozmnožování javoru klenu
(*Acer pseudoplatanus* L.)**

**Autor: Johana Šindelářová
Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Johana Šindelářová

Lesnictví

Název práce

In vitro rozmnožování javoru klenu (*Acer pseudoplatanus* L.)

Název anglicky

In vitro propagation of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.)

Cíle práce

Vypracování literární rešerše – množení javorů pomocí in vitro metod.

Z literárních zdrojů vytvořit metodiku množení javoru klenu a pokusit se založit kulturu z dospělých jedinců javoru klenu.

Metodika

Získání literárních zdrojů pro vypracování literární rešerše – vegetativní pěstování javorů.

Návrh metodiky množení javorů pomocí in vitro metod.

Převod rostlinných částí (pupenů, maldých prýtů) z dospělých stromů do in vitro kultury.

Sledování přežívání rostlinných pletiv v in vitro kultuře.

Doporučený rozsah práce

minimalne 30 stran textu bez příloh

Klíčová slova

javor klen, mikropropagace, nodální segment, sterilizace, pupen

Doporučené zdroje informací

- Bowen-O'Connor C.A., Hubstenberger J., Killough C., Van Leeuwen D.M., St. Hilaire R. (2007). In vitro propagation of *Acer grandidentatum* Nutt. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43(1): 40-50.
- Đurkovič J. (1996). In vitro regeneration of Norway maple (*Acer platanoides* L.). *Biologia Plantarum*, 38(2): 303-307.
- Fernández-Lorenzo J.L., Iglesias-Díaz M.I., Gutiérrez-Araujo O. (2000). Micropropagation of a selected rootstock of *Acer palmatum*. *Acta Horticulturae*, 536: 347-353.
- Lindén L., Riikonen A. (2006). Effects of 6-benzylaminopurine, thioiazuron and type of explant on in vitro shoot development of *Acer platanoides* L. *Propagation of Ornamental Plants*, 6(4): 201-204
- Šedivá J. (2009). Influence of explant type, sucrose and IBA on in vitro growth of *Acer platanoides* L. 'Jirka'. *Acta Horticulturae*, 812: 185-188.
-

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 29. 11. 2018

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 2. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 14. 04. 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „*In vitro* rozmnožování javoru klenu (*Acer pseudoplatanus* L)“ vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 20. dubna 2019

Poděkování

Zejména děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za vedení, odborné rady, věnovaný čas, ochotu, trpělivost a pomoc při vypracování této práce. Dále bych také chtěla poděkovat rodině a Zdendovi za velkou podporu při studiu.

***In vitro* rozmnožování javoru kleny (*Acer pseudoplatanus* L.)**

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá využitím *in vitro* metod pro rozmnožování lesnicky významného javoru kleny (*Acer pseudoplatanus* L.). V této práci je vypracována literární rešerše, která je potřebná pro experimenty s touto metodou vegetativního rozmnožování a rovněž pro vyhodnocení výsledků testování, které trvaly od března do června roku 2018.

Mikropropagace se skládá z několika fází. Výzkum je zaměřen na fázi sterilizace a indukce. V těchto fázích jako zdroje materiálu byly použity nodální segmenty s pupeny tohoto druhu, pocházejícího z arboreta FLD v Kostelci nad Černými Lesy. Při indukční fázi bylo použito MS a WPM médium s různými koncentracemi rostlinných hormonů – Thidiazuron ($0,03 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$), Benzylaminopurin ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), Kinetin ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) a Zeatin ($1,55 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$).

Při výzkumu se podařilo kulturu založit, zvláště při použití WPM média s Thidiazuronem. S vyšší koncentrací TDZ narůstala i úspěšnost indukce prýtů, ale v důsledku vysoké míry kontaminace mnoho explantátu nepřežilo a nepodařilo se kultury multiplikovat.

Klíčová slova: Javor klen, mikropropagace, nodální segment, sterilizace, živné médium, organogeneze

***In vitro* propagation of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.)**

Abstract

This bachelor thesis deals with the *in vitro* micropropagation of maple sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.), a very important woody plant. This thesis includes a literature review which was needed for the experiments based on the method of vegetative propagation and as well as for the assessment of the results of the tests that were taking place from March 2018 to June 2018.

In vitro methods consist of several phases. The research focused on sterilization and induction phases, in which nodal segments with buds of this species coming from the arboretum FFWS in Kostelec nad Černými Lesy were used as source material. The media used in the stage of induction comprised the MS and WPM of different concentrations of phytohormones - Thidiazuron (0,03 mg.L⁻¹; 0,06 mg.L⁻¹), Benzylaminopurin (1,0 mg.L⁻¹; 2,0 mg.L⁻¹), Kinetin (1,0 mg.L⁻¹; 2,0 mg.L⁻¹) and Zeatin (1,55 mg.L⁻¹; 0,75 mg.L⁻¹).

The research was successful in establishing the culture especially when the WPM medium containing Thidiazuron was used. A higher concentration of TDZ also increased the success of shoot induction; however, a high degree of contamination prevented many of the explants from surviving and the culture from multiplying.

Keywords: Sycamore maple, micropropagation, nodal segment, sterilization, nutrient medium, organogenesis

Obsah

1 Úvod a cíle práce	12
2 Literární rešerše	14
2.1 Charakteristika rodu <i>Acer</i>	14
2.1.1 Systematické zařazení a popis	14
2.1.2 Autochtonní druhy	15
2.1.3 Alochtonní druhy	17
2.1.4 <i>Acer pseudoplatanus</i>	18
2.2 Rozmnožování rostlin	20
2.2.1 Generativní rozmnožování	20
2.2.2 Vegetativní rozmnožování	21
2.3 Explantátové kultury rostlin	24
2.3.1 Mikropropagace	25
2.4 Vegetativní rozmnožování javorů pomocí <i>in vitro</i> metod	27
2.4.1 Stádium 0: Výběr a sterilizace mateřské rostliny	29
2.4.2 Stádium 1: Odvození aseptické kultury	29
2.4.3 Stádium 2: Fáze proliferace explantátové kultury	36
2.4.4 Stádium 3: Zakořeňování <i>in vitro</i>	39
2.4.5 Stádium 4: Zakořeňování <i>in vivo</i> a aklimatizace	40
3 Metodika	41
3.1 Příprava rostlinného materiálu	41
3.2 Příprava kultivačního média	42
4 Výsledky	44
4.1 Použitý materiál	44
4.2 Sterilizace explantátu	44
4.3 Iničiační médium pro <i>Acer pseudoplatanus</i>	45
5 Diskuze	49
5.1 Použitý materiál	49
5.2 Sterilizace výchozího rostlinného materiálu	50
5.3 Vliv živného média a koncentrace fytohormonů na prorůstání primárního explantátu (iniciace)	52
6 Závěr	54
7 Seznam použitých zdrojů	55

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Plod javoru klenu (autor)	14
Obrázek 2 - Rozšíření javoru klenu v Evropě (http://www.euforgen.org/species/acer-pseudoplatanus/)	19
Obrázek 3 - Letorosty s pupeny javoru klenu (autor).....	41
Obrázek 4 - Zavedené explantáty v kultivační místnosti (autor).....	43
Obrázek 5 - Explantáty napadené kontaminacemi (autor).....	45
Obrázek 6 - Prýt vytvořený na WPM médiu s TDZ (autor)	46
Obrázek 7 - Vytvořený kalus na MS médiu s BAP (autor)	47

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Systematické zařazení (Novák a Skalický, 2017)	14
Tabulka 2 - Přehled autorů a jejich technik	28
Tabulka 3 - Porovnání složení MS a WPM média (Ali et al., 2009).....	32
Tabulka 4 - Porovnání složení DKW a MS média (Van Sambeek and Preece, 2007)...	37
Tabulka 5 - Složení iniciačních médií	42
Tabulka 6 - Datum odběru primárních explantátů a úspěšnost sterilizace	44
Tabulka 7 - Úspěšnost jednotlivých iniciačních médií a tvorba kalusu	48

Seznam použitých zkratek

2,4-D – kyselina 2,4 – dichlórfenoxyoctová

ABA – kyselina abscisová

BA – benzyl adenin

BAP – 6-benzylaminopurin

DKW – Driver and Kuniyuki Walnut Medium (Driver and Kuniyuki, 1984)

FLD – Fakulta lesnická a dřevařská ČZU v Praze

IAA – β -indolyloctová kyselina

IBA – β -indolylmáselná kyselina

KIN – kinetin

LS – Linsmaier and Skoog medium (Linsmaier and Skoog, 1965)

MS – Murashige and Skoog medium (Murashige a Skoog, 1962)

pH – záporný dekadický logaritmus

NAA – kyselina naftyloctová

TDZ – thidiazuron

WPM – Woody Plant medium (Lloyd and McCown, 1981)

ZEA – zeatin

1 Úvod a cíle práce

Javory (*Acer* spp.) zahrnují velké množství stromů a keřů rostoucích v různých klimatických podmínkách po celém světě, ale převážně na severní polokouli. Podle Národní inventarizace lesů provedené ÚHUL v roce 2011 – 2015, zaujímaly javory asi 4,2 % plochy lesních i nelesních pozemků, přičemž nejvíce jsou rozšířeny javor horský (*Acer pseudoplatanus*), javor babyka (*Acer campestre*) a javor mléč (*Acer platanoides*). Jsou vysazovány podél silnic díky své velmi krásné koruně různých tvarů a barev podzimního listí. V poslední době je u nás rozšířené pěstování původních asijských druhů javorů, jejichž množství kultivarů je cennými solitérami v zahradách a parcích. Velký ekonomický význam javorů se pohybuje od výroby dýh a dlouhotrvajícího masivního nábytku až po výrobu sladkého sirupu. Uplatnění javorů v České republice se může zvyšovat vzhledem k současné kůrovcové kalamitě, přičemž významně narůstá zastoupení listnáčů. Národní inventarizace lesů potvrzuje postupné snižování podílu jehličnatých dřevin ve prospěch dřevin listnatých.

Původní jsou v České republice pouze tři druhy rodu *Acer* spp. - *Acer platanoides*, *Acer campestre* a *Acer pseudoplatanus*. Javor klen, společně s javorem mléčem má v českém lesním hospodářství uplatnění jako dřevina meliorační a zpevňující. Dřevo kleny, zejména v Evropě, je pro své vlastnosti široce využíváno ve stavebním a nábytkářském průmyslu. Pro své rezonanční vlastnosti se javory používají také k výrobě hudebních nástrojů.

Mikropropagace se zdá jako výhodná metoda pro zachování vzácných a ohrožených genotypů, může vést k rychlému získání dostatečného množství rostlinného materiálu a vzhledem k dnešní době, kdy se zvyšuje poptávka po ušlechtilých listnáčích je zvážení *in vitro* metod žádoucí. Ale s mikropropagací javoru kleny bylo dosaženo jen omezeného úspěchu. Je proto důležité pokročit v dostupných technikách a studovat nové, aby se zlepšila kvalita a množství druhů javorů. Klonování buněčnou, tkáňovou a orgánovou kulturou je prokazatelně úspěšnější než tradiční metody, ale klonování dospělých listnatých stromů vybraných pro jejich žádoucí genetické vlastnosti nebylo ve větší míře prozkoumáno.

Tato bakalářská práce se zabývá množением lesnicky významného javoru klenu pomocí *in vitro* metod. Cílem bylo vypracovat literární rešerši z literárních zdrojů, vytvořit metodiku množení javoru klenu a pokusit se založit kulturu z dospělých jedinců. Metoda *in vitro* i přes svoji vyšší finanční náročnost je teoreticky poměrně dobře zvládnutelná, odzkoušená a u nás často používaná metoda vegetativního pěstování. Avšak každá rostlina má své individuální a specifické nároky na podmínky *in vitro* rozmnožování, a proto tato cesta nemusí být vždy úspěšná.

2 Literární rešerše

2.1 Charakteristika rodu *Acer*

2.1.1 Systematické zařazení a popis

Tabulka 1 - Systematické zařazení (Novák a Skalický, 2017)

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	Dvouděložné (<i>Magnoliopsida</i>)
Řád	Mýdelníkotvaré (<i>Sapindales</i>)
Čeleď	Javorovité (<i>Aceraceae</i>)
Rod	Javor (<i>Acer</i>)

Čeleď: *Aceraceae* – javorovité

Do této čeledi se řadí hlavně opadavé jednodomé stromy, někdy i keře. Listy těchto dřevin jsou vstřícné, většinou jednoduché, dlanitolaločné, i dlanitě složené a bezpalistnaté. Květy mohou být v latách, hroznech nebo chocholících a jsou funkčně jednopohlavné. Pestík je zakrnělý a samičí tyčinky s neotevírajícími se prašníky. Plodem javorů je křídlatá dvounažka (Koblížek, 2006).



Obrázek 1 - Plod javoru klenu (autor)

Rod: *Acer* – javor

Javory rostou hlavně v mírném a subtropickém pásu severní polokoule. Původní jsou u nás pouze tři druhy rodu *Acer*. V České republice je nejvíce rozšířený *Acer platanoides* (javor mléč), který se nachází v listnatých lesích a pro lesnické a sadovnické účely je velice významný. Javor klen neboli javor horský (*Acer pseudoplatanus*) obývá horské lesy, je vysazován v parcích a alejích jako okrasná dřevina. V teplých oblastech roste *Acer campestre* (javor babyka). V České republice rostou i nepůvodní druhy, jako jsou *Acer tataricum*, *Acer saccharinum*, *Acer palmatum*, *Acer japonicum*, *Acer ginnala* a *Negundo aceroides* (Novák a Skalický, 2017).

Známe asi 150 druhů javorů stromovitého a keřovitého vzrůstu, které rostou převážně na severoamerickém subkontinentu, ve východní Asii a v Evropě. Javory jsou významné alejové a parkové dřeviny, také je pěstujeme v zahradách. Často se vysazují jako solitéry, zejména druhy s pestře zbarvenými listy. Mají rády živné, čerstvě vlhké půdy, slunná nebo jen mírně zastíněná místa. Okrasné kultivary můžeme množit očkováním, jarním roubováním nebo řízkováním v červnu a červenci (Koblížek, 2006).

2.1.2 Autochtonní druhy

Bez ovlivnění lidské činnosti vznikly areály přirozené, tedy původní (primární). Z toho plyne, že existují i areály nepůvodní, druhotné, které byly výrazně pozměněny v důsledku činnosti člověka. V rámci původních areálů známe druhy autochtonní, tj. danému území vlastní, zde původní, a naopak druhy alochtonní, tj. v daném území nepůvodní, rozšířené mimo oblast svého primárního výskytu (Kincl a spol., 2006).

Jak už bylo zmíněno, na území České republiky známe některé autochtonní druhy javorů. *Acer platanoides* – javor mléčný, přirozeně se nacházející od severního polárního kruhu ve Skandinávii přes celou Evropu od Francie až po Kavkaz. Jeho přirozený areál nezasahuje do Středomoří a na Britské ostrovy, ačkoliv se zde pěstuje (Burnie, 2007).

Javor mléčný, rostoucí v nižších polohách a na příznivých stanovištích vystupuje do 800 m n.m. Roste do výšky okolo 20 až 30 metrů. Jeho koruna je rozložitá a stinná. Borka je podélně rozbrázděná a neodlupčivá. Pětilaločné, zubaté listy jsou zelené na obou stranách, vespod mírně lesklé. V podzimním období se zbarvují do žluta, někdy až do červena. Jak už název javor mléčný napovídá, řapík roní mlékovitou tekutinu. Kvete

ještě před olistěním. Příliš nevýrazné květy jsou žlutozelené, sestavené v latě. Nejlépe roste v hlubších, zvlhlých půdách, ale dokáže snést i sucho. Je citlivý na zasolení (Hurych, 2003). Hospodářsky je to málo významná dřevina, ale u nás je spíše pěstován jako alejový strom. Okrasné kultivary se vysazují v parcích a zahradách. Sirup z mízy tohoto javoru je kvalitnější než u jiných javorů. *Acer platanooides* poskytuje včelám dobrou pastvu (Úradníček a Maděra, 2001).

Dalším původním stromem na našem území je *Acer campestre* (javor babyka). Jeho domovinou je Evropa a Malá Asie, vyskytuje se i v severní Africe (Burnie, 2007). Tento malý až středně velký strom dosahuje výšky od 15 do 25 metrů. Největších výšek dorůstá v lužních lesích a naopak nejmenších (téměř v křovité formě) v lesostepích. Má nepravidelnou, kulovitou korunu a křivý, válcovitý kmen. Jeho listy mají dlouhý řapík, jsou vstřícné a na podzim se barví do žluta nebo červena. Květy, rostoucí v přímých chocholících, se objevují až po olistění. Plodem je dvounažka, která je menší než u mléče. Babyka začíná plodit okolo 30. věku a semenné roky bývají zpravidla každoročně nebo každý druhý rok. Tato dřevina, co se týče zástinu, je velmi tolerantní oproti ostatním javorům. V lužním lese roste na půdách s vysokou spodní hladinou vody a v suchých doubravách s nedostatkem vláhy v létě. Roste na živných půdách, často na suťových a vápencových podkladech. Je odolný vůči zasolení, mrazu a nevdí mu vedra a sucha. U nás se vyskytuje v oblasti lužních lesů a v teplých pahorkatinách. Stejně jako předchozí javor, tak i javor babyka je hospodářsky téměř nevýznamný. Je cenný jako medonosná dřevina a v zahradnictví se většinou nepoužívá. Vysazuje se hlavně pro městské výsadby (Úradníček a Maděra, 2001).

Posledním autochtonním druhem v ČR je *Acer pseudoplatanus*, který bude popsán v kapitole 2.1.4.

2.1.3 Alochtonní druhy

Alochtonních, tedy nepůvodních druhů je u nás spousta, a proto v této kapitole zmíním jen pár z nich. *Acer saccharinum* – javor stříbrný, pochází ze Severní Ameriky. Roste do výšky až 30 metrů. Listy jsou velice pestré, zespondu stříbřitě šedé a na podzim se barví do žluta. Je nenáročný, odolný vůči suchu. Je cenný zejména pro sadovnické účely (Hurych, 2003). Pěstuje se zvláště v parcích a rozlehlých zahradách. Některé země ho vysazovaly jako alejový strom. Bývá zaměňován pro podobnost latinského jména s kanadským javorem cukrovým – *Acer saccharum* (Větvicka, 2001). Javor cukrový je důležitý pro mízu, ze které se vyrábí javorový sirup a pro jeho trvanlivé dřevo. Přirozeně se vyskytuje ve východní části Severní Ameriky (Burnie, 2007). Mezi nejkrásnější javory patří javor šedý (*Acer griseum*), pocházející z Číny. Pěstuje se v zahradách, dosahuje výšky okolo 12 metrů, ale jeho semena klíčí obtížněji než u jiných druhů, takže je velmi těžko dostupný (Vermeulen, 1998).

Listy javoru jasanolistého (*Negundo aceroides*) nejsou podobné listům většiny javorů. Jsou lichozpeřené, 3 - 7četné se špičatými listy. Jeho původním areálem je Severní Amerika. Také z tohoto javoru se těžil cukr. Dalším zástupcem je javor tatarský (*Acer tataricum*), vyskytující se přirozeně hlavně v jihovýchodní Evropě a v Malé Asii. Je to dřevina tolerující nízké teploty (Větvicka, 2001).

Další zástupce pocházející ze Severní Ameriky je javor červený – *Acer rubrum*. Co se týče habitu, podobá se mléči, ale je řidší a méně pravidelný. Má nápadné červené květy. Nevyhovují mu suché a vápenaté půdy (Hurych, 2003).

Mezi významné javory patří i javor dlanitolistý – *Acer palmatum*, pěstovaný v parcích a zahradách. Osidluje především podhorské a horské lesy Japonska, Koreje a Číny, kde dosahuje vysokého vzrůstu okolo 8 metrů. Je pěstován především pro svůj nádherný vzhled, protože na podzim se jeho listy zbarvují do červena (Štursa, 2016).

2.1.4 *Acer pseudoplatanus*

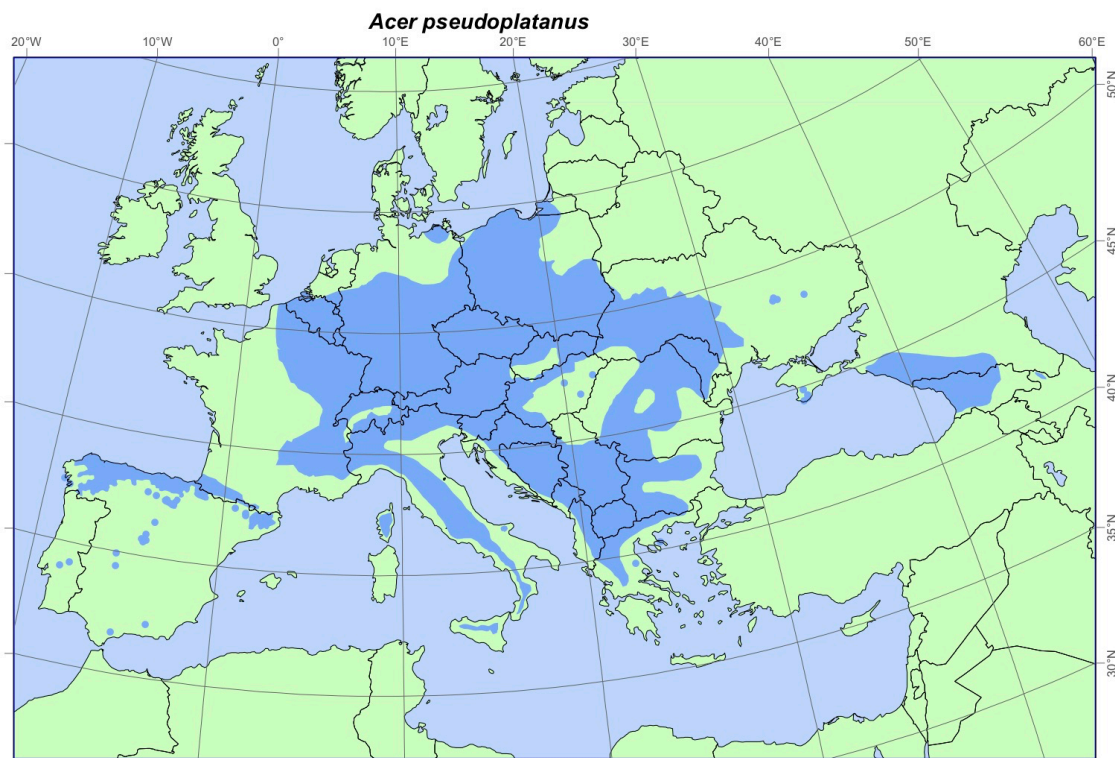
Javor klen dosahuje velkých rozměrů, roste do výšek až 40 metrů. Průměr kmene se pohybuje okolo 2 metrů. Dožívá se asi 400 let. Má přímý kmen válcovitého tvaru a košatou korunu. Kořenový systém je srdčitého tvaru. Silné kořeny pevně zakotvují dřevinu v půdě. Výmladnost javoru kleny je dobrá jen u mladých stromů. *Acer pseudoplatanus* má vstřícné listy s dlouhým řapíkem, jsou dlanitě pětičetně laločnaté a až 20 cm dlouhé. V podzimním období listy žloutnou nebo červenají. Zelenošedé letorosty mají zeleně zbarvené pupeny. Klen kvete v jarním období v dubnu až květnu, kdy současně s kvetením raší listy. Květy jsou žlutozelené, uspořádané v nících hroznech. Plodem kleny je dvounažka, ale oproti našim javorům má vypouklá semena (viz. Obr. 1). Křídla dvounažek svírají ostrý úhel. Začíná plodit po 25. roce. Tato naše původní dřevina dobře snáší střední zástin, avšak je náročná na půdní a vzdušnou vlhkost. Klen je vázán na vlhká stanoviště, ale nesnáší stagnující vodu. Při záplavách nevydrží. V České republice, jak z názvu vyplývá, obývá horská místa s vysokými srážkami. Má rád hluboké, humózní čerstvé půdy s vyšším obsahem skeletu. Je součástí suťových lesů, kde se vyskytuje rovněž s jasanem, bukem, jilmem horským, lípou a javorem mléčem. Roste na vápencových sutích. Vadí mu mráz. U starých stromů se při mrazu tvoří mrazové trhliny jako např. u buku. Klen obývá evropský areál, zejména střední a jižní Evropu. Neroste však v severní a východní Evropě. U nás se nachází v nižších pohořích, kde stoupá do 800–900 metrů. Ojediněle roste i ve vysokých polohách, vystupuje v Krkonoších, Jeseníkách a na Šumavě (Úradníček a Maděra, 2001).

Může být považován za plevelnou dřevinu, protože semení ve velkém množství. Patří mezi užitečné stromy. Je vysazován především v parcích a stromořadích (Burnie, 2007).

Javor klen společně s javorem mléčem mají v českém lesním hospodářství uplatnění jako dřeviny meliorační a zpevňující, také jsou považovány jako produkční dřeviny. Javor klen je cenný zvláště v technické formě. V našich podmínkách je klen součástí listnatých a smíšených lesních porostů, v podhorských a horských oblastech, málo v pahorkatinách a ojediněle v nížinách. Setkáváme se s ním od kolinního do supramontánního stupně. *Acer pseudoplatanus* je předmětem českého lesního hospodářství především z důvodů ekologických, s ohledem na objemovou produkci a jakost dřeva. S javorem mléčem jsou součástí druhové skladby lesních porostů v řadě

hospodářských souborů. V našich lesích se klen vyskytuje převážně jednotlivě nebo jako skupinová příměs ve smíšených porostech. Pokud roste na příznivých stanovištích je jeho produkce srovnatelná s produkcí buku a jasanu. Dřevo kleny je středně těžké a tvrdé. Snadno se opracovává, leští, barví a lakuje. Využit je tedy v nábytkářském průmyslu a uměleckém truhlářství. Rovněž se používá jako součást hudebních nástrojů, též v soustružnictví, rezbářství, sochařství. Javory jsou silně ohrožovány okusem zvěře v porovnání se škodlivými přírodními vlivy, které na domácí javory tolik nepůsobí (Šindelář, 2000).

Pouze u javoru kleny můžeme nalézt plodnice vřeckovýtrusné houby svašťelky javorové (*Rhytisma acerinum*), která se vyskytuje na stanovištích s více méně čistým, neznečištěným ovzduším (Štursa, 2016).



Obrázek 2 - Rozšíření javoru kleny v Evropě
(<http://www.euforgen.org/species/acer-pseudoplatanus/>)

2.2 Rozmnožování rostlin

Všechny organizmy mají možnost produkovat sobě podobné potomstvo. Tento proces je nazýván jako rozmnožování, tj. schopnost reprodukovat se a tím zvětšit počet jedinců daného druhu. Rozlišujeme dva způsoby rozmnožování: nepohlavní a pohlavní (Slavíková, 2002).

Evolučně starší a jednodušší je nepohlavní rozmnožování a z něj se později vyvinulo složitější a mnohem dokonalejší způsob rozmnožování, tedy pohlavní rozmnožování (Šmarda, 2003).

2.2.1 Generativní rozmnožování

Generativní neboli pohlavní rozmnožování znamená množení dřevin pomocí semena. Tento způsob množení je využit především pro účely okrasného školkařství (Vilkus, 2000).

Pokud mluvíme o generativním rozmnožování krytosemenných rostlin, rostlinné organismy mají pro rozmnožování specifické pohlavní orgány, v nichž se tvoří gamety (pohlavní buňky). Tedy rozeznáváme samičí a samčí pohlavní orgány: pestík a tyčinky (Novák a Skalický, 2017).

Při pohlavním rozmnožování vznikne nový jedinec. Embryo (zárodek) je vyvinut dlouhým mitotickým dělením. Pohlavním procesem se rozumí splynutí dvou pohlavních buněk (gamet), za vzniku zygoty. Pokud splynou gamety, jedná se o oplození. Při oplození se chromozomy nespojují, takže zygota má dvojnásobný počet chromozomů. Takový počet označujeme jako diploidní a jeho poloviční počet označujeme jako haploidní. Zygota, jež vznikla splynutím dvou gamet, se dále podílí na růstu a vývoji zárodku. Dále se zárodek vyvíjí v nového, kompletního jedince. Gamety těchto vzniklých jedinců se od sebe navzájem liší, většinou tvarově i funkčně. Samčí gamety mají generativní jádra pylových láček a samičí gamety jsou vaječné buňky. Nově vzniklý jedinec není totožný se žádným ze svých rodičů, protože generativní rozmnožování zajišťuje proměnlivost jedinců druhu, tedy vznikající jedinec je vybaven souborem genů otce i matky. Generativní rozmnožování se od vegetativního liší tím, že při pohlavním rozmnožování není nově vzniklý jedinec geneticky shodný s rodičem kvůli genetické odlišnosti obou rodičů (Slavíková, 2002).

Rožmnořování ze semen je účelné jen když jsou si alespoň téměř všichni jedinci potomstva navzájem shodní v určité kombinaci relativně stálých, význačných znaků, jimiž se odlišují od jedinců populace jiného druhu, popř. odrůdy. Tímto způsobem množené dřeviny se většinou udrží v extrémních a nepříznivých přírodních podmínkách mnohem lépe než dřeviny množené vegetativní cestou. Za další výhodu tohoto množení můžeme považovat menší finanční náročnost, zejména při masovém množení dřevin (Walter, 1997).

Osivem nazýváme semena používaná ve školkařství. Při pohlavním rozmnořováním semenem je kladen velký důraz na genetické vlastnosti matečných dřevin. Klíčivé semeno vzniká zpravidla po oplodnění. Semenem nelze množít křížence a odrůdy okrasných dřevin, pokud chceme zachovat jednotný vzhled. Pouze některé odrůdy červenolistých javorů si zachovávají své zbarvení. V praxi je osivo získáváno pouze z uznaných porostů (Vilkus, 2000).

U rodu *Acer* je osivo získáváno prostřednictvím shrabování čerstvě opadaných plodů, a však plody vzácnějších stromů je možno trhat rovnou z matečných rostlin. V lesnické praxi sklízíme osivo pouze ze stromů semenných. Je doporučeno osivo skladovat pod lesní hrabankou, po sklizni jej přečistit, rozprostřít a nechat oschnout. Osivo javoru klenu sklízíme v září. Plody opadávají zvláště v říjnu. Klíčivost semen je udávána v rozmezí 80–90 % (Walter, 1997).

2.2.2 Vegetativní rozmnořování

Oproti pohlavnímu rozmnořování je organismus vzniklý nepohlavní cestou ze somatických buněk zcela shodný s rodičem, tzn. má s ním shodný genotyp. Jedinec je vytvořen z oddělené části rodičovského organismu – tedy z buněk rodičovského jedince. Tyto čerstvě vzniklá potomstva se nazývají klony (shodní jedinci). Mezi způsoby nepohlavního rozmnořování patří množení prostřednictvím vegetativních orgánů (cibule, oddenky, hlízy, výhonky atd.). Části rostlin jako jsou stonek, list a kořen mají schopnost zakořenit se, a proto jsou používány při množení asexuální cestou. V lesnictví, zemědělství a šlechtitelské praxi se usiluje o rozmnořování co nejvyššího počtu geneticky shodných jedinců, proto se používá např. metoda řízkování (Šmarda, 2003).

Použití této rozmnořovací metody je výhodné zejména kvůli rychlé reprodukci rostlin v porovnání s generativním množením. U řady rostlin a dřevin je vegetativní

rozmnožování jediný možný způsob množení, např. některé zavlečené druhy mimo oblast původního rozšíření se dokáží reprodukovat pouze prostřednictvím nepohlavního rozmnožování. V rámci České republiky se takto reprodukuje puškvorec obecný nebo vodní mor kanadský. V nepříznivých růstových podmínkách kolem horní hranice lesa rostou některé dřeviny, které se množí více méně jen vegetativní cestou. V praxi se používají různé metody, jak můžeme dřeviny rozmnožit nepohlavní cestou, tj. metoda řízkování, hřížení, roubování a zásadně moderní množení v laboratořích prostřednictvím explantátových kultur (Kincl a spol., 2006).

Zpravidla můžeme rozlišovat následující způsoby asexuálního rozmnožování: dělení, regenerace a reprodukce pomocí specifických rozmnožovacích tělísek. Proces dělení je známý pro jednobuněčné organismy. Regenerace je chápána jako schopnost rostliny nahrazovat chybějící části těla a do ní řadíme již zmíněné hřížení, očkování, roubování a *in vitro* (Novák a Skalický, 2017).

Walter (1998) uvádí další rozdělení vegetativního rozmnožování na přímé a nepřímé. Do přímého řadíme např. řízkování a hřížení a do nepřímého hlavně štepování neboli roubování.

Řízkování

V zahradnictví je řízkování považováno za nejpoužívanější způsob vegetativního rozmnožování. Je možné množit dřevitými, bylinnými nebo kořenovými řízků. Rozmnožování bylinnými řízků je způsob méně používaný, ale za to můžeme množit tímto způsobem ovocné i okrasné stromy. Dřevité řízků špatně zakořeňují, ale tento způsob množení se používá u okrasných dřevin, zvláště u opadavých keřů, jako jsou *Ligustrum*, *Cotoneaster* a *Acer negundo*. Množení kořenovými řízků využíváme při množení maliníku, ostružiníku, lísky a dalších. Při všech zmíněných typech je doporučeno použít růstové stimulanty (Vilkus, 2000).

Javorů jsou řízkovány v červnu (*Acer palmatum*), v březnu, červenci a v případě javoru stříbrného koncem srpna (Walter, 1998).

Hřížení

Existují dva typy hřížení: obyčejné a paprskové. Hřížení je možné použít u rybízu, meruzalky, *Rhododendron*, lísky, vinné révy apod. (Vilkus, 2000).

Tento způsob množení je charakteristický především tím, že větvička nebo výhon zůstává spojený s mateční rostlinou až do potřebného zakořenění. Walter (1998) uvádí i další typy hřížení, tj. obloukovité (hřížení jednoletých nebo dvouletých výhonků obloukovitě do země), vlnovité, hadovité nebo čínské. Poslední tři způsoby jsou používány zejména k rozmnožování dřevin s dlouhými výhony, které mají pnoucí keře. Hřížením se dříve běžně množily druhy javorů, jako jsou *Acer negundo*, *Acer saccharinum*, *Acer carpinifolium*, *Acer cappadocicum* a jiní (Walter, 1998).

Roubování

Dalším způsobem nepohlavního rozmnožování je roubování, při kterém je přenášena část jednoletého výhonku, nebo letorostu bez listů, ale s očky (pupeny) z roubu na podnož. Roubování rozlišujeme na předjarní, jarní a letní. V jarních obdobích můžeme dosáhnout nejlepších výsledků. Na ujmutí roubů má vliv hlavně počasí, např. vítr, déšť a sníh (Vilkus, 2000).

Roubování je forma vegetativního množení, při které je šlechtěná odrůda identická s matečnou rostlinou. Roubováním jsou zachovány vlastnosti rostliny. V zásadě jsou známy dva způsoby roubování. První je metoda, kdy jsou použity výhony s jedním nebo několika očky (pupeny). Druhým způsobem je očkování (okulace), při němž je využit pouze jeden pupen (Klock, 2002).

Walter (1998) udává, že štěpování znamená spojení roubu nebo očka s podnoží – dřevina, na kterou štěpujeme. Pnoucí rostliny (plamének a podražec) se nesnadno množí, a proto se roubojí na vlastní kořeny. Technika štěpování je ze všech výše popsaných typů nejnáročnější, co se týče techniky. Štěpování je využito zvláště pro druhy a kultivary, které nelze množit jiným způsobem anebo jen nesnadno.

Vilkus (2000) píše, že štěpování je nejrychlejší druh vegetativního rozmnožování. Rostlina, na kterou štěpujeme, tedy podnož je velmi důležitá ve spoustu směrech, tj. má snadno srůst s roubem, dobře se množit, má být zdravá a odolná vůči škůdcům a chorobám.

2.3 Explantátové kultury rostlin

Dle Petru a Řetovského (1956) je explantátová kultura část rostlinného organismu izolovaná za účelem kultivace *in vitro*. Za explantát jsou považovány semena, pletiva, orgány, spóry a další.

Procházka a Šebánek (1997) popisují explantátové kultury jako kultivaci již oddělených, izolovaných rostlinných částí, orgánů, buněk, pletiv a protoplastů v umělých podmínkách. Rozlišujeme explantátové kultury zejména podle kultivovaného explantátu nebo charakteru pletiva. Tedy jsme schopni rozlišit kultury izolovaných semen, embryí a orgánové kultury. Orgánové kultury jsou kultury orgánu, které se dokáží množit prostřednictvím stonků, kořenů, listů, meristémů a pupenů, ale také rovněž prostřednictvím generativních orgánů – poupata, květy, pestíky, tyčinky apod. Orgánové kultury dělíme na kalusové, buněčné a protoplastové. Tyto jednotlivé typy výše zmíněných kultur od sebe lišíme zvláště metodickou náročností při zakládání.

Explantát je část pletiva nebo orgánu rostlinného druhu vzniklá oddělením neboli izolováním orgánu mateřské rostliny za určitých aseptických podmínek, dále je explantát přenesen na vhodné kultivační médium, které je odlito do skleněných nebo plastových nádob. Živné médium umožňuje nejenom dělení buněk, ale i růst explantátu. Aby kultura měla možnost rozmnožit se, musí médium obsahovat minerální živiny, cukr (zvláště ve formě sacharózy), vitamíny (thiamin, pyridoxin, myo – inositol), auxiny (IAA, NAA nebo 2,4-D) a cytokininy (kinetin, benzylaminopurin – BAP, trans – zeatin).

Rostlinné buňky, pletiva a orgány jsou tzv. totipotentní, díky této schopnosti může rostlina růst a vyvíjet se v aseptických kulturách *in vitro*. Buňky explantátu se během několika dnů začínají neorganizovaně dělit (organizované dělení probíhá v meristémech) a tvořit kalus, který spočívá v dediferenciaci buněk. Dělení je vyvoláno růstovými regulátory – auxinem a cytokininem, nebo je kalus tvořen při poranění pletiva docházejícímu při manipulaci s explantátem. Kalus můžeme vidět za normálních okolností v přírodním prostředí, kde se tvoří při poranění, hojení či po infekci *Agrobacteriem* (Luštinec a Žárský, 2003).

Velký vliv na explantátové kultury má nejenom kultivační živné médium, ale i teplota, vlhkost, světelné podmínky, fotoperioda a rovněž i orgány, ze kterých byl explantát odebrán, období odběru explantátu, kvalita donorové rostliny a genotyp. Po umístění explantátu do kultivačních podmínek, nejprve začne explantát reagovat na

poranění, ke kterému došlo při izolaci, poté reaguje na ztrátu vlivu celistvé rostliny a následuje reakce na kultivační podmínky. V horším případě může dojít k rychlému odumření nebo pouhému přežívání explantátu bez očekávaných změn. Po izolaci explantátu může vznikat kalus – neorganizovaně rostoucí pletivo. Později dochází k diferenciaci buněk (Petrů a Řetovský, 1956).

Hlavním a nejdůležitějším cílem *in vitro* je v krátkém čase rozmnožit rostlinný organismus a tímto procesem získat novou rostlinu, popřípadě více rostlin. Tyto nově vzniklé rostliny jsou totožné nebo naopak netotožné s donorovou rostlinou (= rostlina, ze které byl odebrán původní explantát). Tohoto cíle je dosaženo navozením morfogeneze či regenerace v pletivech. V případě nově vzniklých orgánů, nebo i celého jedince, proběhne v diferencované buňce dediferenciace a následně opět diferenciaci, která se ale liší od té předchozí. K tomuto procesu dojde buď přímo, kdy vzniká nová struktura rovnou z dediferencovaných buněk nebo nepřímo, to značí nejdříve vytvoření neorganizovaně rostoucího pletiva – kalusu, v němž probíhá diferenciaci. Na dediferenciaci a diferenciaci mají velký vliv rostlinné hormony. Rozlišujeme organogenezi, přičemž se vytváří orgány jako jsou kořeny, prýty, listy a pohlavní orgány, dále somatickou embryogenezi (ze somatických buněk se vytváří embrya) a pylovou embryogenezi-vznikají zárodky z nezralých pylových zrn (Procházka a Šebánek, 1997).

2.3.1 Mikropropagace

Nepohlavní rozmnožování rostlin prostřednictvím kultur izolovaných meristémů je označováno termínem mikropropagace. Meristémové kultury sloužící k vegetativnímu rozmnožování rostlin z izolovaných meristémů, které jsou získávány z apikálních a laterálních pupenů, dokážou stvořit celou rostlinu. Rozdíl od tkáňové kultury spočívá v použití jednoduchých medií bez fytohormonů regulujících tvorbu kalusu – v orgánové kultuře se kalus netvoří. Mikropropagace se liší od kalusových kultur především potomstvím, které je v případě mikropropagace homogenní (Luštinec a Žárský, 2003).

Význam a využití mikropropagace

Laboratorní metody *in vitro* („ve skle“) jsou využity k rychlému vegetativnímu množení (klonování) využívající pouze některé části mateřských rostlin. Touto metodou nepohlavního rozmnožování se však velmi rychle šíří choroby, zvláště virové (Chloupek, 2008).

Současné lesnictví má především cíl zachovat „přírodě blízké“ lesní biotopy, jejichž druhová skladba by měla být s interakcí se stanovištními poměry, tedy cílem není obnova původní dřevinné skladby lesního prostředí. V tomto případě je důležité zajistit kvalitní sadební materiál, a hlavně zajistit odolné odrůdy, které musí splňovat požadavky stoupající poptávky po dřevě. Kvalitní materiál lze získat mikropropagačními technologiemi *in vitro* – rychlým namnožením rostlinného materiálu. Tak naše současné lesnictví může zachránit i silně ohrožené a cenné druhy. Rovněž cílem moderního zemědělství je vytvořit vysokoprodukční a odolné odrůdy zemědělských plodin (Malá, 2010).

V této době se zvyšuje potřeba většího zastoupení listnatých stromů. Kromě už dříve hodně pěstovaného buku a dubu je zájem i o jiné ušlechtilé listnáče, ke kterým řadíme různé druhy rodu *Tilia*, *Fraxinus*, *Alnus*, *Sourbus*, *Ulmus*, *Prunus*, *Carpinus*, *Betula*, *Juglans*, *Pyrus*, *Malus* a hlavně *Acer*. Tento nápad může přispět k větší stabilitě lesních porostů, ke zvýšení produkce dřeva a tím ke zvýšení hodnoty dřeva na trhu. Metody *in vitro* mohou pomoci vypěstovat v krátkém čase rychle rostoucí rezistentní genotypy, které jsou dobře přizpůsobené klimatickým a půdním podmínkám. Tyto technologie zajistí stabilitu lesních porostů a vysokou produkci vysoce hodnotných dřevních sortimentů (Chalupa, 2001).

2.4 Vegetativní rozmnožování javorů pomocí *in vitro* metod

Pokud chceme rozmnožit rostlinu v *in vitro* podmínkách, potřebujeme speciální vybavení explantátového pracoviště. Je požadován prostor pro mytí skla a dalších pomůcek (dřezy k mytí skla, zdroj vody), prostor pro přípravu a sterilizaci médií (prostory ke skladování chemikálií, autokláv, digitální pH metr, lednice, mraznička), déle skladovací prostory na chemikálie a sklo, prostor pro očkování s aseptickými laminárními boxy, kultivační místnost a také skleník (Hradilík, 2005).

Jestliže chceme úspěšně zvládnout kultivaci explantátových kultur je nutné zajistit sterilitu rostlinného materiálu (explantátu), živných médií a prostředí, ve kterém se jsou orgánové kultury pěstovány. Příčinou kontaminace plísněmi a bakteriemi je právě nedostatečná nebo špatná zvládnutelnost sterilizace. Pokud není explantátová rostlinná část zbavena těchto kontaminací, množí se v kultivačním médiu a obvykle je tímto explantát poškozen a následně je zapotřebí zlikvidovat celý obsah nádoby. Je potřebné sterilizovat kultivační prostor, popř. očkovací místnost prostřednictvím ultrafialového záření. Očkovací prostor se sterilizuje otřením boxu 95% etanolem za přítomnosti proudění vzduchu. Používané kovové nástroje a sklo můžeme sterilizovat v horkovzdušném sterilizátoru. Veškeré, takto sterilizované předměty je vhodné uzavřít pomocí alobalu. Nástroje, které byly touto metodou sterilizovány, se při práci pravidelně opalují nad plamenem kahanu po předchozím ponoření do 95% etanolu. Sterilizování živných roztoků se provádí v autoklávu. Autokláv je tlaková nádoba, ve které je živný roztok sterilizován horkou parou za zvýšeného tlaku. Tato forma sterilizace je prováděna při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa po dobu, která závisí pouze na objemu médií (Kováč, 1992).

Hradilík (2005) prezentuje, že pokud nemáme k dispozici autokláv, je možná sterilizace v zavařovacím hrnci při 95°C po dobu 15 minut. Sterilizaci živných roztoků lze provádět i prostřednictvím filtrace. Pokud chceme realizovat sterilizaci živného roztoku, musíme zavřít nádobu uzávěrem, např. uzávěrem vytvořeným z alobalu. Je zmíněna především důležitost povrchové sterilizace orgánu např. 0,5% chloridem rtuťnatým nebo 70% etanolem.

Základem k vytvoření této kapitoly byly zdroje Mahesh (2009), Pollard a Walker (1990) a Kováč (1992).

Mikropropagaci můžeme členit do čtyř fází:

- Stádium 0: výběr a sterilizace matečné rostliny
- Stádium 1: odvození aseptické kultury
- Stádium 2: fáze proliferace explantátové kultury (tvorba adventivních prýtů)
- Stádium 3: zakořeňování *in vitro*
- Stádium 4: zakořeňování *in vivo* a aklimatizace

Do současné doby byly vyvinuty některé techniky *in vitro* rozmnožování pro několik *Acer* druhů, a to *A. platanooides* (Ďurkovič, 1996), *A. pseudoplatanus* (Wilhelm, 1999), *A. palmatum* (Fernández-Lorenzo, 2000), *A. platanooides* (Šedivá, 2009), *A. grandidentatum* (Bowen-O'Connor, et al., 2007) a další. Na následujících stránkách budou zmíněny techniky *in vitro* těchto a dalších autorů.

Tabulka 2 - Přehled autorů a jejich technik

Sterilizace					
Autor	Druh	Doba odběru	Typ explantátu	Koncentrace činidla	Doba působení
Ďurkovič (1996)	<i>Acer platanooides</i>	-	axilární pupeny, listové kotouče, řapíky, řízky	0,4% roztok chinosolu 0,1% roztok chloridu rtuťnatého	30 min 15 - 30 min
Bowen-O'Connor, et al. (2007)	<i>Acer grandidentatum</i> Nutt.	červen říjen	segmenty s jedním nebo dvěma pupeny	chlornan sodný	5 min
Šedivá (2009)	<i>Acer platanooides</i>	-	nodální segmenty s axilárními a apikálními pupeny	2,5 % chlornan sodný	30 min
Wilhelm (1999)	<i>Acer pseudoplatanus</i>	září	semena (hypokotily, radikule, plumule)	3% roztok chlornanu sodného, 70% ethanol	10 min 10 s
Lindén a Riikonen (2006)	<i>Acer platanooides</i>	únor	axilární a apikální pupeny	70% ethanol, 0,5 % chlornan sodný	1 min 20 min
Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000)	<i>Acer palmatum</i>	září duben	segmenty větví axilární výhonky	70% ethanol, 0,8 % chlornan sodný	30 s 15 min

2.4.1 Stádium 0: Výběr a sterilizace mateřské rostliny

Před zahájením mikropropagace je výběr matečné rostliny velmi rozhodující. Měli bychom přesně znát původ matečné rostliny. Je vhodné vybrat výchozí rostlinu bez jakékoliv choroby kvůli snížení kontaminace kultury. Úspěch a růst explantátu je ovlivněn obdobím, kdy je explantát odebrán (podzim nebo jaro). Nejlepších výsledků je dosaženo, pokud je explantát odebrán z matečné rostliny v aktivním procesu růstu. Určité růstové parametry lze zlepšit předběžnou úpravou mateřského explantátu před zahájením celého procesu.

2.4.2 Stádium 1: Odvození aseptické kultury

Prvním krokem je výběr vhodné dřeviny, která bude použita k odběru určité její části (explantátu). Cílem této etapy je umístit vybrané explantáty do kultury, vyhnout se kontaminacím a poskytnout prostředí pro podporu produkce prýtů. Je nutné explantát povrchově dezinfikovat, tj. opláchnutí materiálu vodou a nadále aplikace dezinfekčních činidel. Dezinfekční roztok má za úkol zničit mikroorganismy přítomné na povrchu explantátu. Nejvíce se používají dezinfekční činidla jako jsou: chlorové vápno, 10-15% roztok SAVO Super a Chloramin B, ale také je doporučeno přidat do dezinfekčního roztoku pár kapek Jaru nebo Tweenu-20. Po sterilizaci je vhodné ponořit explantát do destilované vody. Ty konce explantátu, které jsou poškozené, odstraníme skalpelem a upravíme do požadované velikosti. Po tomto procesu je explantát umístěn do kultivační nádoby, kde se nachází ztuhlé nebo tekuté médium.

Đurkovič (1996) množil *Acer platanoides*. Materiálem pro tuto kulturu byly použity axilární (úžlabní) pupeny, listové disky, řapíky a řízky z jednoletých a dvouletých sazenic javoru mléče. Materiál byl dezinfikován 0,4% roztokem fungicidu chinosislu (30 min) a poté byla provedena povrchová sterilizace v 0,1% roztoku chloridu rtuťnatého (15-30 min). Dále byly přidány kapky Tweenu-20. Následně byl explantát omyt sterilní destilovanou vodou a umístěn na WPM (Lloyd a McCown, 1980) a MS (Murashige a Skoog, 1962) živné médium.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) se zabýval rozmnožováním *Acer grandidentatum* Nutt. Materiál (apikální pupeny) byl odebrán z dvouletých sazenic tohoto druhu javoru. Dřevina byla rozdělena na apikální (terminální), střední a bazální část podle výšky dřeviny. Explantáty byly povrchově sterilizovány promytím pod tekoucí vodou (2 min) a rovněž byly ponořeny do roztoku chlornanu sodného (35% Clorox) se sterilní deionizovanou vodou a několika kapkami mycího prostředku – Proctor and Gamble, Cincinnati, OH. Po povrchové sterilizaci následovalo umístění explantátu na MS, LS (Linsmaier and Skoog, 1965), DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) a WPM médium.

Pomocí techniky *in vitro* byl množen javor mléč (Šedivá, 2009). Výhonky *Acer platanoides* L. 'Jirka' byly odebrány z pětiletého stromu. Nodální segmenty byly povrchově sterilizovány v 2,5% chlornanu sodném s přídavkem 2 kapek Tweenu-20 po dobu 30 minut. Následně se explantát třikrát propláchnul ve sterilní deionizované vodě. *In vitro* kultura byla vytvořena z nodálních segmentů s axilárními a apikálními pupeny. Explantáty byly přesunuty na WPM médium.

Wilhelm (1999) se zabývala mikropropagací javoru kleny s použitím TDZ. Jako zdroj materiálu byla použita semena, která byla namáčena ve vodě po dobu 12 hodin. Povrchová dezinfekce byla provedena dvakrát po sobě 3% roztokem chlornanu sodného po dobu 10 minut. Následovalo ošetření 70% ethanolem (10 s) a potom byl materiál třikrát omyt sterilní vodou. Po dezinfekci byly svrchní vrstvy semene odstraněny a embrya byla rozříznuta do plumulí, hypokotylů a radikulí. Poté byly explantáty přemístěny do 25 ml MS médií.

Lindén a Riikonen (2006) se věnovali účinku BAP, TDZ a výběru typu explantátu u javoru mléče (*Acer platanoides*). Z jednoročních letorostů javoru mléče byly vybrány apikální a axilární pupeny. Tyto explantáty byly povrchově sterilizovány v 70% etanolu (1min) a následně byly omyty ve sterilní deionizované vodě. Dále se materiál opět dezinfikoval v roztoku 0,5% chlornanu sodném (20 min) a třikrát omyl ve sterilní deionizované vodě. Pomocí mikroskopu byly v aseptickém prostředí vyříznuty pupeny a odstranily se vnější šupiny pupenu. Poté byl explantát umístěn do zkumavek obsahujících 10 ml WPM média.

Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) mikropropagovali podnož *Acer palmatum*. Materiál byl odebrán z výhonků čtyřletého podnože tohoto javoru. Jako zdroj explantátu pro účely mikropropagace byly získány segmenty letorostů a axilární výhonky. Omyté segmenty byly ponořeny do fungicidního roztoku kaptanu (angl. *captan*) a benomilu. Dále byly segmenty umístěny do nádob s destilovanou vodou a poté byly zavedeny do kultivační místnosti při teplotě 24 °C a relativní vlhkosti 80 %. Po 14-21 dnech byly očištěné segmenty použity jako zdroj explantátu. Explantáty byly zbaveny listů a jejich povrch byl dezinfikován postupným ponořením do 70% etanolu (30 s) a v 0,8% chlornanu sodném (15 min). Následovaly 3 opláchnutí ve sterilní destilované vodě. Kultivace proběhla na WPM médiu.

Kultivační podmínky umožňují především růst a vývoj explantátu. Zahrnují médium, ze kterého rostlina čerpá energii, výživu a regulační látky. Dále k nim patří světelný režim zahrnující intenzitu, kvalitu světla a fotoperiodu. Důležitou roli má i teplota a plynná fáze uzavřeného kultivačního prostředí (Procházka a Šebánek, 1997). Paquereau-Trapy a Guern (1983) zjistili v rámci buněčné kultury javoru klenu, že pro dělení buněk je potřebná vyšší koncentrace 2,4-D při nižší teplotě (16°C) než při teplotě vyšší (25°C).

Rozhodujícím faktorem pro úspěšnost kultivace je také vhodné zvolení média. Živné médium by mělo plně zajistit výživu explantátu, jeho růst i vývoj. George et al. (2008) píše, že pro zdravý a energetický růst je třeba, aby rostliny přijaly relativně velké množství některých anorganických prvků (tzv. hlavních živin rostlin) – ionty dusíku, draslíku, vápníku, fosforu, hořčíku a síry a malá množství dalších prvků – železo, nikl, chlor, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Kultivační média jsou tedy tvořena roztoky následujících složek:

- Makroelementy,
- Mikroelementy,
- zdroj uhlíku,
- vitamíny,
- aminokyseliny,
- růstové hormony,
- látky používané pro zpevnění médií (Mahesh, 2009).

V současné době se nejvíce používají média pro *in vitro* rozmnožování dřevin, která se od sebe liší hlavně jejich složením, náročností přípravy a použitím a to jsou: Murashige and Skoog (MS), Linsmaier and Skoog (LS), Woody Plant Medium (WPM) a další.

Tabulka 3 - Porovnání složení MS a WPM média (Ali et al., 2009)

Komponenty	MS médium mg/L	WPM médium mg/L
dusík:		
Dusičnan amonný	1650	400
Dusičnan draselný	1900	-
Dusičnan vápenatý	-	96
sulfáty:		
Heptahydrát síranu hořečnatého	370	370
Síran draselný	-	990
Dihydrát chloridu vápenatého	440	96
Fosforečnan draselný	170	170
chelátové železo:		
Heptahydrát síranu železnatého	27,8	27,8
Kyselina ethylendiamintetraoctová	37,3	37,3
mikroelementy:		
Monohydrát síranu manganičitého	22,3	22,3
Heptahydrát síranu zinečnatého	8,6	8,6
Hexahydrát dusičnanu zinečnatého	-	-
Kyselina boritá	6,2	6,2
Jodid draselný	0,8	-
Dehydrát molybdenanu sodného	0,25	0,25
Pentahydrát síranu měďnatého	0,02	0,25
Hexahydrát chloridu kobaltnatého	0,02	-
organické látky:		
Myo-inositol	100	100
Glycin	2	2
Pyridoxin hydrochlorid	0,5	0,5
Kyselina nikotinová	0,5	0,5
Thiamin	1	1

Makroelementy

Makroelementy jsou v podstatě anorganické soli zahrnující šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, vápník, hořčík, síru a draslík. Uhlík, vodík a kyslík jsou čerpány z prostředí. Koncentrace každého prvku je závislá na formulacích určených pro morfogenezi. Koncentrace prvků nad $0,5 \text{ mM.L}^{-1}$ patří mezi makro prvky a koncentrace pod $0,5 \text{ mM.L}^{-1}$ se řadí mezi mikro prvky. Dusík je potřebný pro syntézu aminokyselin, proteinů a nukleových kyselin. Vápník je důležitým komponentem buněčné stěny. Hořčík je klíčový komponent chlorofylu a řadí se mezi prvky fotosyntézy (Mahesh, 2009).

Kováč (1992) uvádí, že živné médium by mělo obsahovat okolo 25-60 mM anorganického dusíku. Nitráty jsou dodávány do média v koncentraci 25-40 mM, amonium 2-20 mM, draslík 20-20 mM a forfor, hořčík, síra a vápník v rozsahu 1-3 mM.

Mikroelementy

Do kultivačních médií jsou přidány mikroelementy: železo, mangan, zinek, bór, měď, molybden a rovněž kobalt, jód, sodík a chlór. Většina mikroelementů (Fe, Mn, Zn, Cu, Co) jsou složky proteinů rostlinných buněk s metabolickým významem a mají určitou funkci v chloroplastech. Mangan je použit v koncentraci mezi 25 a 150 mM. Přítomnost manganu může pomoci zvýšit počet pupenů na explantátu. Mnoho výzkumů se hlavně zaměřuje na význam železa v kultivačním médiu, protože železo je nezbytný prvek (Mahesh, 2009).

Měď a kobalt se dodávají v koncentraci $0,1 \text{ }\mu\text{M}$, železo a molybden $1 \text{ }\mu\text{M}$, jód $5 \text{ }\mu\text{M}$, zinek $5\text{-}30 \text{ }\mu\text{M}$, mangan $20\text{-}90 \text{ }\mu\text{M}$ a bór $25\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$ (Kováč, 1992).

Zdroj uhlíku

Kultivační média obsahují obvykle i sacharidy nahrazující uhlík, které rostlina za normálních podmínek fixuje z atmosféry prostřednictvím fotosyntézy (George et al., 2008). Nejčastěji je používána sacharóza jako zdroj uhlíku, výjimečně glukóza a fruktóza. Obvykle se sacharóza dodává do média v 2-3% množství (Hradilík, 2005).

Mahesh (2009) píše, že v médiích jsou použity i jiné sacharidy jako maltóza a rafinóza, ale Kováč (1992) dokazuje, že tyto sacharidy nejsou tolik efektivní v porovnání se sacharózou a glukózou.

Vitamíny

Rostlina je schopna sama syntetizovat vitamíny, které jsou nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Rozeznáváme thiamin, kyselinu nikotinovou, pyridoxin a myo-inositol. Thiamin je dodáván do médií v koncentraci 0,1 až 10 mg.L⁻¹ a je pro růst orgánových kultur nepostradatelný. Kyselina nikotinová a pyridoxin se do médií přidávají, ale nejsou tak potřebné jako předchozí vitamín. Kyselinu nikotinovou přidáváme v množství 0,1 – 5 mg.L⁻¹ a pyridoxin 0,1 – 10 mg.L⁻¹. Myo-inositol se nachází ve většině kultivačních médiích v koncentraci 50 – 5000 mg.L⁻¹. V živných médiích se mohou vyskytovat i další vitamíny (biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin), ale jejich přítomnost není nezbytná (Kováč, 1992).

Aminokyseliny

Hradilík (2005) definuje aminokyseliny jako operativní zdroj dusíku, který je rostlinným explantátem rychle využíván a jejich přítomnost stimuluje růst explantátu. Za aminokyseliny považuje např. glycin, L-glutamin a L-asparagin v množství do 100 mg.L⁻¹. Při vyšších koncentracích mohou tyto aminokyseliny inhibovat růst rostlinného explantátu.

Růstové hormony

Procházka a Šebánek (1997) uvádí, že růstové regulátory se nepřidávají do připravovaného média přímou navážkou, ale pomocí zásobních roztoků. Ty jsou uchovávány po určitou dobu při snížené teplotě (okolo 0-4 °C). Celý kultivační proces může proběhnout na médiích, kde se výchozí obsah rostlinných regulátorů nemění. Často se však hormony kvantitativně i kvalitativně mění v průběhu kultivace. Jiné složení je použito např. pro indukci kalusu, pro zakořenění regenerovaných prýtů apod. Auxiny se do média přidávají hlavně v kombinaci s cytokininy. Přítomnost auxinů podporuje indukci kalusu, stimuluje buněčné dělení, dlouhivý růst a buněčnou diferenciaci, dále stimuluje tvorbu adventivních kořenů.

Luštinec a Žárský (2003) píše, že hlavním auxinem je kyselina indol-3-octová (IAA), dále v rostlinách byly zjištěny i další auxiny – kyselina indol-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylactová. V praxi se používá spíše NAA a 2,4-D.

Cytokininy podporují indukci tvorby prýtlů, stimulují buněčné dělení, stimulují tvorbu pupenů a zabraňují stárnutí pletiv. Známe více než 30 přirozených cytokininů (adenin, zeatin a v praxi nejčastěji používaný kinetin a BAP).

Gibereliny stimulují dlouhivý růst buněk v nadzemních orgánech, stimulují klíčení semen a ovlivňují pohlaví květů. Kyselina abscisová (ABA) růstové procesy naopak inhibuje, urychluje opad listů, květů a plodů, vyvolává dormanci pupenů, semen a hlíz, urychluje stárnutí pletiv, vyvolává uzavření průduchů. Etylen je jediný plynný fytohormon, který stimuluje dozrávání některých plodů, urychluje stárnutí pletiv a tím vyvolává opad listů, květů a plodů. Brassinosteroidy při nízkých koncentracích stimulují růst a zvyšují odolnost rostlin proti suchu a nízké teplotě (Luštinec a Žárský, 2003).

Procházka a Šebánek (1997) píše, že brassinosteroidy působí spíše *ex vitro* na prodloužení stonků a morfogenezi. V kulturách *in vitro* nenašly širší uplatnění.

Látky používané pro zpevnění média

Pro přípravu médií se většinou používá gelizující agar. Je-li smíchán s vodou, je schopen se přeměnit v gel při teplotě až 100 °C, který tuhne už při 45 °C. Tuhost tohoto gelu je především závislá na pH média, druhem a množstvím agaru. Agar se obvykle dodává do média v koncentraci mezi 0,5 a 1 % pro polotuhá média a 2 % pro tuhá média. Difco Bacto Agar se řadí mezi nejpoužívanější a nejefektivnější agary (Mahesh, 2009).

Kováč (1992) píše o důležitosti čistoty používaného agaru. Tento gel obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík. Nečistoty můžeme limitovat namočením agaru do redestilované vody po 24 hodin, poté propláchnutím v etanolu a následném vysušením. Ke zpevnění média je možné rovněž použít i agarózu, Phytigel a Gerlite (1,25 - 2,5 g.L⁻¹).

2.4.3 Stádium 2: Fáze proliferace explantátové kultury

Hlavním cílem této etapy je namnožení explantátů. Rostlinný materiál z předchozího stádia je opakovaně pasážován na živné médium, přičemž se zvyšuje počet explantátů v kultuře. Tento proces množení trvá až do dosažení požadovaného počtu explantátů. Mnohonásobné prýty jsou odděleny a transplantovány na nové kultivační médium. Prýty se subkultivují každých 2–8 týdnů. Multiplikace zahrnuje čtyři používané metody, jako jsou: multiplikace zprostředkovaná pomocí tvorby kalusu, multiplikace prostřednictvím adventivních prýtů nebo apikálních a axilárních prýtů, či prostřednictvím přímé nebo nepřímé embryogeneze. Adventivní prýty vznikají z jiných základů než z axilárních pupenů a vrcholových meristémů. Adventivní prýty mohou vznikat ze stonků, listů, hlíz, cibulí a dalších. Vznik kalusu představuje stupeň mezi výchozím explantátem a nově vzniklou rostlinou v procesu nepřímé organogeneze. Mikropropagace představuje opakované pasážování adventivně vzniklých orgánů, které znovu produkují adventivní orgány. Orgány jsou poté převedeny do dalšího stádia k zakořenění a vytvoření celé rostliny.

Đurkovičovo (1996) WPM a MS kultivační médium bylo doplněno bacto agarem ($6\text{--}7\text{ g.L}^{-1}$), sacharózou (20 g.L^{-1}) a kombinací $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ BAP s $0,05\text{ mg.L}^{-1}$ NAA nebo KIN ($0,1; 0,5; 1,0$ a $2,0\text{ mg.L}^{-1}$). Média byla autoklávována po dobu 20 minut při teplotě 121°C . Kultury byly přesazovány v pravidelných intervalech (každé 4 týdny) na další živné médium.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) při *in vitro* rozmnožování *Acer grandidentatum* Nutt. použil 4 typy médií – MS, LS, DKW a WPM. DKW médium bylo doplněno o TDZ ($0,00022; 0,0022$ a $0,022\text{ mg.L}^{-1}$). Přítomnost TDZ způsobila buněčné dělení, nikoliv prodloužení buněk. Prýty byly dále přemístěny na další média obsahující zeatin ($2,20; 3,50; 4,40$ a $6,00\text{ mg.L}^{-1}$). Co se týče složení médií, DKW médium obsahovalo některé nutrienty, které ostatní média postrádají nebo mají nižší koncentraci. V porovnání s WPM médium, DKW má vyšší koncentraci některých makroelementů, jako jsou síran draselný a dusičnan vápenatý. DKW dále obsahuje i dusičnan zinečnatý a síran nikelnatý, zatímco ostatní testovaná média jej neobsahují.

Tabulka 4 - Porovnání složení DKW a MS média (Van Sambeek and Preece, 2007)

Komponenty	MS médium g/L	DKW médium g/L
dusík:		
Dusičnan amonný	82,5	98
Dusičnan draselný	95	-
Dusičnan vápenatý	-	98
sulfáty:		
Heptahydrát síranu hořečnatého	18,5	37
Síran draselný	-	78
chelátové železo:		
Heptahydrát síranu železnatého	1,39	1,65
Kyselina ethylendiamintetraoctová	1,88	2,25
mikroelementy:		
Monohydrát síranu manganičitého	1,11	1,7
Heptahydrát síranu zinečnatého	0,43	-
Hexahydrát dusičnanu zinečnatého	-	0,085
Kyselina boritá	0,31	0,25
Jodid draselný	0,042	-
Dehydrát molybdenanu sodného	0,013	0,02
Pentahydrát síranu měďnatého	0,0013	0,0125
organické látky:		
Myo-inositol	5	5
Glycin	0,1	0,1
Pyridoxin hydrochlorid	0,025	-
Kyselina nikotinová	0,025	0,05
Thiamin	0,005	0,1
pH	5,6 - 5,7	

Šedivá (2009) použila při mikropropagaci javoru mléče WPM médium doplněné zeatinem ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), 100 mg.L^{-1} myo-inositolu, 20 g.L^{-1} sacharózy a vitamíny. Agar (Sigma-Aldrich) byl použit v množství $7,5 \text{ g}$. Hodnota pH média se pohybovala okolo 5,7. Všechny kultury byly kultivovány při $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pod 16h fotoperiodou. Explantáty byly pasážovány na další čerstvá média každé 3 týdny. Médium bylo doplněno o 20 nebo 30 g.L^{-1} sacharózy a o $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ zeatinu. Dvacet ošetřených explantátů bylo kultivováno do skleněných nádob obsahujících 25 ml média.

Wilhelm (1999) použila pro rozmnožování javoru klenu MS médium doplněné o 3% sacharózu, 0,8 % Difto Noble agaru, 1,0 g.L⁻¹ glutaminu, 50 mg.L⁻¹ glycinu, 50 mg.L⁻¹ serinu a 100 mg myo-inositolu a různými kombinacemi růstových hormonů. Hodnota pH byla upravena na 5,8. Kultury byly inkubovány při 25°C pod bílým fluorescenčním světlem s 16h fotoperiodou. Indukované prýty byly odděleny (15 až 20 mm) od rodičovské tkáně a umístěny do 25 ml MS média s 0,225 mg.L⁻¹ BA nebo 0,0088 mg.L⁻¹ TDZ kvůli další indukci prýtů. Po pěti týdnech se projevilo prodloužení prýtů.

Lindén a Riikonen (2006) a jejich WPM médium bylo doplněno o 0,49 mg.L⁻¹ KIN. Zkumavky s médiem byly uzavřeny hliníkovou fólií. Po 35 dnech byly axilární a apikální pupenové explantáty přeneseny na 40 ml médium obsahující 0; 0,0022; 0,022; 0,22 nebo 1,1 mg.L⁻¹ TDZ a 0; 0,023 nebo 0,23 mg.L⁻¹ BAP. Každých 35 dní se explantát umístil na čerstvé médium. Experiment byl opakován s použitím TDZ v koncentracích 0,0055; 0,0165; 0,022 mg.L⁻¹ bez přítomnosti BAP. Oba experimenty byly provedeny na WPM médiu s 20 g.L⁻¹ sacharózy a 6 g.L⁻¹ agaru (Biokar diagnostics). Hodnota pH byla okolo 5,6. Kultury byly kultivovány pod 16h fotoperiodou 23°C /17°C světlostní/temnostní fáze.

Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) se pokoušeli rozmnožit *Acer palmatum*. Explantáty byly umístěny do nádob obsahující 15 ml WPM média s 0,01 mg.L⁻¹ TDZ, 3 % sacharózy a 0,7 % Difto-Bacto Agar. Hodnota pH média byla 5,6. Kultury byly udržovány v kultivační místnosti (16h fotoperioda a 25°C /20°C světlostní/temnostní fáze). Jako multiplikační médium bylo použito výchozí médium s 0,01 mg.L⁻¹ TDZ nebo 0,1 mg.L⁻¹ BA. Byly testovány různé koncentrace TDZ (0,01 - 0,02 a 0,05 mg.L⁻¹). V dalším experimentu, multiplikační médium + 0,01 mg.L⁻¹ TDZ bylo porovnáno s multiplikačním médiem +0,01 mg.L⁻¹ TDZ + 0,1 mg.L⁻¹ IAA. Ve třetím experimentu, byly porovnány 2 typy agarů v multiplikačním médiu + 0,01 TDZ mg.L⁻¹. Značka agaru může být důležitým faktorem ovlivňujícím multiplikaci prýtů. Difto Bacto Agar se ukázal jako lepší se srovnáním s Panreac's Agar Bacteriológico Tipo Europeo.

2.4.4 Stádium 3: Zakořeňování *in vitro*

V tomto stádiu dochází většinou k jednorázové kultivaci prýtů odvozených ve stádiu 2. po dobu 2-4 týdnů. V této fázi prýty vytvoří kořeny, prodlouží se a zakoření. Stupeň zakořeňování znamená přesazování z *in vitro* do podmínek *ex vitro* v místnostech s kontrolovaným prostředím, ve skleníku. V současné době se upřednostňuje spíše zakořeňování *in vivo*, protože zakořeňování *in vitro* představuje i některé záporné vlastnosti, jako jsou: vysoká cena a pracnost, častá nefunkčnost kořenů takto odvozených po přenesení rostlin do půdy a další. Hlavní výhodou *ex vitro* ve srovnání s *in vitro* je, že poškození kořenů během přenosu do půdy je méně pravděpodobné. Jenom malý počet druhů rostlin dokáže tvořit kořeny ve 2. stádiu na médiích s vysokou koncentrací cytokininů (kvůli inhibici tvorby kořenů). Je-li potřebné zakořeňování ve 3. stádiu, je nutné používat jiné kultivační médium. Tvorba kořenů je ovlivněna růstovými regulátory, makroelementy, mikroelementy, organickými komponenty, světlem, teplotou atd. U některých druhů indukce tvorby kořenů vyžaduje přítomnost auxinu (IAA, NAA, IBA). Zakořeňování může být dále ovlivněno obsahem sacharidů, makro a mikroelementů v médiu. Dalším podnětem k zakořeňování je i teplo. Teploty okolo 25–28 °C můžou stimulovat tvorbu kořenů.

Pro zakořeňování javoru mléče (Ďurkovič, 1996) bylo médium doplněno o auxiny – IBA v koncentracích 0,3 a 1,0 mg.L⁻¹.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) použil IAA, která indukovala zakořeňování (1,75 mg.L⁻¹).

Šedivá (2009) zkoušela 2 experimenty pro zakořeňování. Prýty o délce 2 cm byly umístěny do skleněných nádob obsahujících 5 ml ½ WPM média doplněného o IBA (0,5; 10; 20 mg.L⁻¹) po dobu 7 dní ve tmě při 22±2°C. Druhý experiment spočíval v použití prýtů, které byly přeneseny na ½ WPM médium bez růstových hormonů (angl. *PGR-free*) pod 16h fotoperiodou.

Wilhelm (1999) pro zakořeňování odebrala 20-30 mm dlouhé prýty a umístila je do 10 ml MS média s 25 mg.L⁻¹ IBA po dobu 24 hodin, poté je převedla do MS média bez obsahu růstových hormonů.

Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) použili WPM médium pro zakořeňování (počáteční médium + 0,0 nebo 1,0 mg.L⁻¹ IBA). Výsledky se ukázaly po 28 dnech.

2.4.5 Stádium 4: Zakořeňování *in vivo* a aklimatizace

Tímto se rozumí zakořeňování prýtlů odvozených *in vitro* v nesterilních podmínkách na substrátech (perlit, vermikulit, směsi s pískem, rašelina, čedičová vata atd.). Aklimatizace v tomto smyslu znamená přenos regenerovaných rostlin do půdy za přirozených podmínek prostředí. Transplantace rostlin odvozených *in vitro* do půdy je často charakterizována nižší mírou přežití. Substrát by měl být slabě kyselý až neutrální. Tento proces zakořeňování se provádí tak, že se prýty (pocházející ze 2. stádia) izolují, vloží se do roztoku auxinu na pár sekund a dále se přemístí do vlhkého substrátu. Kontaminaci rostlin po jejich přenosu do *in vivo* podmínek je možné zabránit aplikací fungicidů a po důkladném opláchnutí zbytků média usazeného na kořenech rostliny. Ve 4. stádiu je nezbytná aklimatizace rostlin na podmínky vnějšího prostředí. Aklimatizací se rozumí především snížení vzdušné vlhkosti a přechodu na autotrofní způsob výživy. Je možné rostliny uzavřít do průhledných boxů nebo přikrýt fólií, či pěstovat ve skleníku.

Đurkovič (1996) přesunul zakořeňené prýty *A. platanooides* na perlitový substrát a tyto rostliny byly pěstovány při vysoké relativní vlhkosti po dobu 4-6 týdnů.

Šedivá (2009) přenesla zakořeňené prýty na substrát (perlit, rašelina) a ty byly aklimatizovány pod vysokou vlhkostí po dobu 2 týdnů.

Zakořeňené rostlinky byly přeneseny do substrátu sestávajícího z písku a perlitu. Prýty byly aklimatizovány ve skleníku po dobu 3 týdnů – 90 % vlhkosti (Wilhelm, 1999).

Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) aklimatizovali zakořeňené prýty ve skleníku. Po 2 měsících 95 % živých jedinců rostoucích v rašelinovém substrátu bylo umístěno do *in vivo* podmínek.

3 Metodika

3.1 Příprava rostlinného materiálu

Pro primární iniciaci byly odebrány explantáty javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) získané z Arboreta FLD v Kostelci nad Černými Lesy. Pro založení explantátové kultury byly použity nodální segmenty s jedním nebo dvěma pupeny dospělého klenu (54 let). Z každého letorostu bylo odebráno přibližně 10–20 pupenů, které byly vloženy do nádoby s destilovanou vodou. Ve sterilním (aseptickém) prostředí byly odstraněny svrchní šupiny pupenů, které byly dále sterilizovány v 0,05% roztoku chloridu rtuťnatého (40 dl HgCl₂ + 40 dl H₂O) s přidáním pár kapek detergentu, v tomto případě Jaru nebo Tweenu-20. Následně byl explantát omyt sterilní destilovanou vodou a umístěn na živná média.



Obrázek 3 - Letorosty s pupeny javoru klenu (autor)

3.2 Příprava kultivačního média

Pro kultivaci javoru klenu bylo použito MS a WPM kultivační médium s přísadami TDZ (0,03; 0,06 mg.L⁻¹), BAP (1,0; 2,0 mg.L⁻¹), KIN (0,5; 1,0 mg.L⁻¹) a ZEA (1,55; 0,75 mg.L⁻¹). Sacharóza byla dodána v koncentraci 20 g.L⁻¹ a myo – inositol v množství 100 mg.L⁻¹. Připravené médium bylo zpevněno agarem (8 g.L⁻¹) a pH bylo upraveno pomocí KOH (hydroxid draselný) na hodnotu 5,7 – 5,8.

Tabulka 5 - Složení iniciačních médií

Iniciační médium	TDZ [mg/l]	BAP [mg/l]	KIN [mg/l]	ZEA [mg/l]
MS	0,03	1,0	0,5	1,55
	0,06	2,0	1,0	0,75
WPM	0,03	1,0	0,5	1,55
	0,06	2,0	1,0	0,75

Připravená média jsou poté umístěna do mikrovlnné trouby po dobu pár vteřin až do ohřátí na teplotu varu. Tento proces je důležitý pro důkladné rozpuštění agaru v roztoku. Po těchto úkonech se připravené médium rozlije do kultivačních nádob (přibližně 30 ml média) a nadále jsou nádoby umístěny a sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 105 kPa po dobu 20 minut.

Po sterilizování byly nádoby s médii vyndány z autoklávu. Tato média byla použita až následující týden. Za tuto dobu můžeme opticky rozeznat případné nedokonalosti média, např. kontaminace plísněmi.

Před zahájením práce s explantáty je potřebné vydezinfikovat celý pracovní prostor flow boxu. Tento prostor je ošetřen a ořen čistícími prostředky, například: 70% lihem, aby byly odstraněny bakterie a viry. Pro udržení aseptického prostředí je nutné zapnout cirkulaci vzduchu, které chrání pracovní prostor před bakteriemi a případně plísněmi. Je nezbytné také sterilizovat použité pomůcky, které jsou použity při manipulaci s explantátem. Nástroje jako jsou: kahan, sterilní nůžky, pinzeta, nádoby pro umístění explantátů jsou sterilizovány v parním sterilizátoru.

Nodální segmenty byly pasážovány na čerstvá média ve flow boxu (laminární box s horizontálním prouděním vzduchu) pomocí sterilních nástrojů, které byly pravidelně máčeny v lihu a následně opáleny nad kahanem. Pupeny byly postupně vkládány do nádob, které byly uzavřeny plastovým víčkem nebo hliníkovou fólií. Média byla

uložena v kultivační místnosti s klimatizací při teplotě 22 ± 1 °C a regulací osvětlení 16/8 (světlostní/temnostní fáze) hodin denně. Explantáty byly pasážovány na čerstvé médium pravidelně každé 3–4 týdny.



Obrázek 4 - Zavedené explantáty v kultivační místnosti (autor)

4 Výsledky

Pokus byl započat 12. 3. 2018 a skončil koncem června téhož roku.

4.1 Použitý materiál

Pro tento experiment bylo použito 271 nodálních segmentů s pupeny javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*). Bylo zavedeno 192 nodálních segmentů s pupeny na WPM médiu a pouze 79 na MS médiu. Odběr explantátu byl proveden na jaře (březen–duben) (Tab. 6).

4.2 Sterilizace explantátu

Pomocí 0,05% roztoku HgCl₂ s přidáním dvou kapek Jaru nebo Tweenu-20 byly sterilizovány všechny odebrané explantáty po dobu 5 minut. Byl zaznamenán jen malý úspěch při této metodě sterilizace, protože většina zavedených explantátů zkontaminovala. Nejúspěšnější sterilizace byla zpozorována v první polovině března (26,7 %) a pak koncem března (25 %), nejnižší úspěšnost byla koncem dubna (6,25 % popř. 10,42 %). Explantáty zavedené na kultivačním MS nebo WPM médiu s přísadkou různých fytohormonů (viz. Tab. 5) v prvním týdnu nekontaminovaly, ale po 2-3 týdnech po založení kultury začaly podléhat kontaminacím. Zbylé nekontaminované prýty byly přesazeny na čerstvé médium ve stejném složení.

Tabulka 6 - Datum odběru primárních explantátů a úspěšnost sterilizace

Datum odběru	% úspěšné sterilizace
12.3.	26,67
19.3.	12,50
26.3.	25,00
9.4.	14,06
20.4.	6,25
27.4.	10,42



Obrázek 5 - Explantáty napadené kontaminacemi (autor)

4.3 Iniciační médium pro *Acer pseudoplatanus*

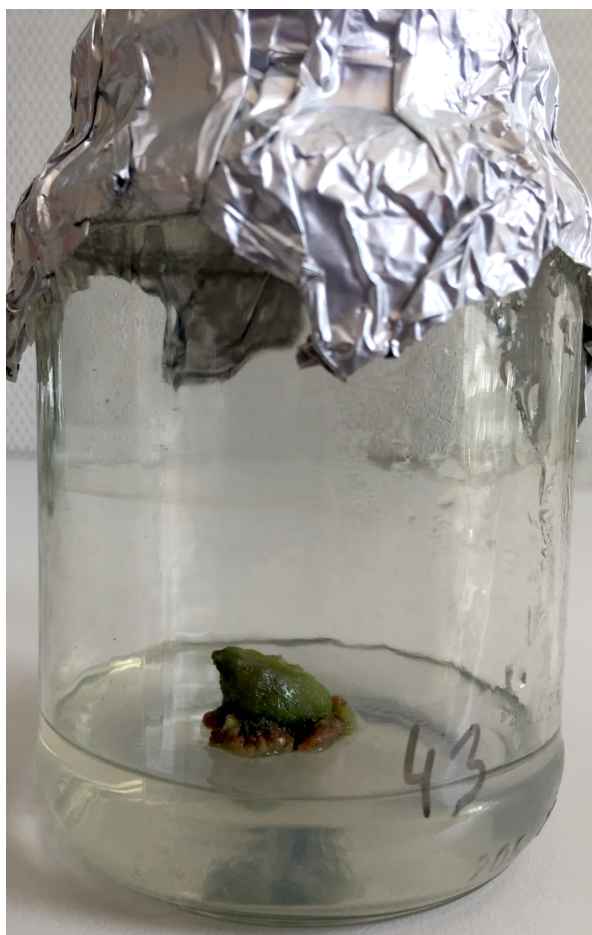
Pro mikropropagaci javoru klenu bylo použito MS a WPM iniciační médium. Iniacce explantátů proběhla úspěšně, ale za období probíhajícího výzkumu se nepodařilo navodit multiplikaci prýťů, a proto pokusy dále nepokračovaly.

Nebyly zpozorovány velké rozdíly mezi WPM a MS médii, a to ani přes to, že se používaly různé rostlinné hormony v několika koncentracích. I přes tyto nevýrazné rozdíly bylo nejlepších výsledků dosaženo na WPM médiu s TDZ v koncentracích 0,06 a 0,03 mg.L⁻¹ kdy bylo dosaženo 31,25 % resp. 18,75 % úspěšnosti. Při zvýšení koncentrace TDZ se podařilo vytvořit prýty a kulturu úspěšně iniciovat.



Obrázek 6 - Prýt vytvořený na WPM médiu s TDZ (autor)

Explantáty zavedené na MS médiu s 1 mg.L^{-1} BAP začaly velmi dobře prorůstat, ale záhy vytvářely v hojné míře kalusovou hmotu. Na ostatních MS médiích byla tvorba kalusu omezena nebo se vytvářelo kalusu jen menší množství. Obdobný trend byl i na WPM médiu.



Obrázek 7 - Vytvořený kalus na MS médiu s BAP (autor)

Téměř nulové iniciace bylo dosaženo při použití kinetinu a zeatinu. Explantáty na tyto rostlinné hormony v použitých koncentracích více méně nereagovaly. Pouze MS médium se zeatinem v koncentracích $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ a $1,55 \text{ mg.L}^{-1}$ způsobilo iniciaci explantátů (12,5 % úspěšné iniciace).

Tabulka 7 - Úspěšnost jednotlivých iniciačních médií a tvorba kalusu

Médium	% úspěšné iniciace	Tvorba kalusu
MS + 0,03 mg/L TDZ	12,5	*
MS + 0,06 mg/L TDZ	25	*
MS + 0,5 mg/L BAP	16,13	*
MS + 1,0 mg/L BAP	37,5	***
MS + 1,0 mg/L KIN	12,5	-
MS + 2,0 mg/L KIN	0	*
MS + 1,55 mg/L ZEA	12,5	-
MS + 0,75 mg/L ZEA	12,5	-
WPM + 0,03 mg/L TDZ	18,75	*
WPM + 0,06 mg/L TDZ	31,25	*
WPM + 0,5 mg/L BAP	6,25	**
WPM + 1,0 mg/L BAP	12,5	**
WPM + 1,0 mg/L KIN	0	-
WPM + 2,0 mg/L KIN	0	-
WPM + 1,55 mg/L ZEA	0	-
WPM + 0,75 mg/L ZEA	0	-

5 Diskuze

Množení pomocí *in vitro* metod, zejména množení prostřednictvím mikropropagace má řadu výhod, je-li úspěšně zvládnuta technika:

- 1) Kultura je odvozena z malých částí rostlin, a proto tato metoda vyžaduje málo prostoru k produkci velkého množství rostlin.
- 2) Tento způsob vegetativního rozmnožování se provádí v aseptických podmínkách. Jakmile je kultura zvládnuta, nemělo by docházet k úhynu rostlin v důsledku onemocnění.
- 3) Mikropropagace zajišťuje rychlé rozmnožování oproti tradičním metodám.
- 4) Rostliny lze rozmnožovat během celého roku bez ohledu na meteorologické podmínky.

Po zmínění mnoha výhod, které nám přináší mikropropagace je důležité zmínit i hlavní nevýhody této metody. K těm patří např. drahé vybavení laboratoře, finančně náročný provoz laboratoře (chemikálie, energie, ...) a poměrně vysoká pracnost této metody.

Tento výzkum můžeme rozdělit do fází: sterilizace materiálu, iniciační médium a sledování vlivu dvou médií s různými koncentracemi fytohormonů.

5.1 Použitý materiál

Kromě médií může i typ explantátu ovlivnit rychlost množení. Mok (1994) uvedl, že větší úspěch množení je zaznamenán u explantátů, které jsou odebrány z apikálních poloh. Možným vysvětlením zesílení množení apikálních explantátů jsou zvýšené hladiny endogenních rostlinných regulátorů, jako je cytokinin. Podle výše popsaných metod a technik byly jako zdroj materiálu pro toto rozmnožování javorů použity axilární pupeny, apikální pupeny, listové kotouče, řapíky, řízky, nodální segmenty s vrcholem nebo bez vrcholu, semena (plumule, hypokotyl a radikule) a výhonkové segmenty.

Đurkovič (1996) testoval listové kotouče, které se ukázaly jako špatný zdroj explantátu, protože nedošlo k žádné proliferaci buněk. Po 6-7 týdnech zahynuly. Řapíky podle Đurkoviče tvořily kalus na WPM médiu ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP a $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ NAA). Nejméně kalusu bylo vytvořeno při kultivaci čerstvých řízků na MS médiu ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP a $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ NAA). Žádné adventivní prýty nebyly indukovány z řapíkatých

segmentů a z čerstvých řízků. Ze všech explantátů se uchytily pouze prýty vypěstované z axilárních pupenů.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) použil axilární pupeny ze semenáčků pěstovaných ve skleníku a Šedivá (2009) založila kulturu z nodálních segmentů s axilárními a apikálními pupeny. Wilhelm (1999) uvádí, že po zahájení kultivace začaly plumule a hypokotyly produkovat kalus (červeně pigmentovaný). Lindén a Riikonen (2006) napsali, že axilární pupeny produkovaly více internodií než apikální pupeny. Jejich výsledky ukázaly, že axilární pupeny mohou více profitovat při nižší koncentraci TDZ než pupeny apikální.

5.2 Sterilizace výchozího rostlinného materiálu

Při povrchové sterilizaci je potřebné dezinfikovat odebraný materiál z donorové dřeviny a minimalizovat množství poškození buněk. Ke sterilizaci explantátu se v praxi používá především roztok chlornanu sodného nebo chloridu rtuťnatého, přičemž činidla na bázi rtuti jsou toxická.

Autoři Badoni a Chauhan (2010) sterilizovali *Solanum tuberosum* pomocí HgCl_2 (0,1 %) a NaOCl (1 %) a porovnávali účinek těchto činidel a dobu (2, 5 a 8 minut), po kterou byl materiál sterilizován. Tato studie ukázala, že při prodloužení doby sterilizace pomocí HgCl_2 se zvýšila mortalita explantátů. HgCl_2 vykazovala vyšší mortalitu než NaOCl . Nejnižší mortalita byla pozorována sterilizací prostřednictvím NaOCl po dobu 5 minut. Výsledek také ukázal, že při nárůstu času došlo ke snížení infekce při použití obou chemikálií. Data ukázaly, že s nárůstem času se také zvýšila míra přežití při užití NaOCl a HgCl_2 . Experiment prokázal, že lepší byl NaOCl než HgCl_2 . Chlornan sodný byl vybrán jako vhodná sterilizační chemická látka a doba, po kterou byl explantát sterilizován by měla být okolo 8 minut.

Při sterilizaci javorů autoři: Bowen-O'Connor, et al. (2007), Šedivá (2009), Wilhelm (1999), Lindén a Riikonen (2006), Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) použili roztok chlornanu sodného v různých koncentracích a pouze Ďurkovič (1996) použil chlorid rtuťnatý.

Đurkovič (1996) použil jako zdroj materiálu axilární pupeny, listové kotouče, řapíky, řízky semenáčku *Acer platanoides*, které ošetřil v 0,4% roztoku chinosolu (fungicid) po dobu 30 minut, dále probíhala povrchová sterilizace pomocí 0,1% roztoku chloridu rtuťnatého (15-30 minut) s přidáním Tweenu-20.

Lindén a Riikonen (2006) odebrali rostlinný materiál (axilární a apikální pupeny) z desetiletého *Acer platanoides* v únoru. Tyto explantáty byly povrchově vydezinfikovány v 70 % ethanolu po dobu 1 min, opláchnuty ve sterilní deionizované vodě a znovu dezinfikovány v 0,5% chlornanu sodném (20 min).

Šedivá (2009) sterilizovala nodální segmenty s axilárními a apikálními pupeny *Acer platanoides* (5 let starý strom). Segmenty byly povrchově sterilizovány 2,5% chlornanu sodném po dobu 30 minut s přídavkem 2 kapek Tweenu-20.

Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) získali dva druhy primárního explantátu – segmenty letorostů a axilární výhonky ze čtyřletého *Acer palmatum*. Segmenty letorostů byly odebrány v září a axilární výhonky v dubnu. Segmenty letorostů se promyly a byly ponořeny do fungicidního roztoku kaptanu a benomilu. Následně byly umístěny do destilované vody a zavedeny do kultivační místnosti. Po 14-21 dnech byly povrchově dezinfikovány po dobu 30 sekund v 70% ethanolu a 15 minut v 0,8% chlornanu sodném. Následovaly tři výplachy ve sterilní destilované vodě. Co se týče kontaminace, mnohem lepší výsledky byly zpozorovány u segmentů, které byly dlouhodobě máčeny v destilované vodě než z přímo získaných výhonků. Výzkum uvádí v prvním případě jen 21 % kontaminovaných vzorků a u druhého případu 60 % kontaminovaných.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) odebral explantáty (segmenty s jedním nebo dvěma pupeny) z dvouletých sazenic *Acer grandidentatum* Nutt. pěstovaných ve skleníku. Explantáty byly poprvé odebrány v červnu a v říjnu, poté byly povrchově sterilizovány pod tekoucí vodou (2 minuty) a ponořeny na 5 minut do roztoku 282,1 μM (21 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) chlornanu sodného.

Wilhelm (1999) se zabývala mikropropagací *Acer pseudoplatanus*, jehož semena byla shromážděna v září a namočena ve vodě po dobu 12 hodin. Povrchová dezinfekce byla prováděna dvakrát 3% roztokem chlornanu sodného po dobu 10 minut s následným ošetřením 70% ethanolom po dobu 10 sekund a třemi proplachy sterilní vodou.

5.3 Vliv živného média a koncentrace fytohormonů na prorůstání primárního explantátu (iniciace)

Pro rozmnožování dřevin rodu *Acer* se používá hlavně WPM médium a MS médium.

Bowen-O'Connor, et al. (2007), Šedivá (2009), Lindén a Riikonen (2006), Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz a Gutiérrez-Araujo (2000) a Ďurkovič (1996) zkoušeli WPM médium pro rozmnožování některých druhů javorů. Ďurkovič (1996) rovněž použil MS médium, stejně jako Wilhelm (1999), která se zabývala mikropropagací javoru klenu. Bowen-O'Connor, et al. (2007) psal o rozmnožování *Acer* pomocí dalšího média – DKW média.

Nebyly zpozorovány významné rozdíly mezi médii. Rozdíly byly nalezeny pouze v porovnání fytohormonů. Autoři (Wilhelm, 1999; Bowen-O'Connor, et al., 2007; Lindén a Riikonen, 2006) byli úspěšní s fytohormonem TDZ v koncentracích 0,00022 – 0,0022 mg.L⁻¹.

Ďurkovič (1996) použil WPM i MS médium pro mikropropagaci *Acer platanoides*. Nejlepší výsledek byl viděn na WPM médiu doplněném o KIN (0,5 mg.L⁻¹). Pro zakořenění prýtů Ďurkovič použil poloviční WPM médium s 1,0 mg.L⁻¹ IBA. Tyto prýty vyprodukovaly 2-6 kořínků během 4 týdnů.

Bowen-O'Connor, et al. (2007) experimentoval s mnoha médii: MS, LS, DKW a WPM. Ukázalo se, že nejvhodnějším médiem je DKW médium s TDZ v koncentracích (0,00022; 0,0022 a 0,022 mg.L⁻¹) pro rozmnožování *Acer grandidentatum*. Přítomnost TDZ vyvolalo buněčné dělení. DKW médium se zdálo být úspěšné, protože došlo k proliferaci mikroprýtů a IAA indukovala zakořenění. Explantáty pěstované na DKW médiu nejrychleji rostly (3,97krát více než na WPM médiu). Vzhledem k tomu, že MS médium se používá ve většině studií, tyto výsledky naznačují, že by měla být použita i jiná média pro rozmnožování tvrdých javorů. Bowen-O'Connor, et al. (2007) doporučuje zkusit DKW médium se zeatinem (2,19 mg.L⁻¹) a s IAA (1,75 mg.L⁻¹).

Wilhelm (1999), která rozmnožovala javor klen na MS médiu, uvedla, že počet prýtů se zvyšoval s rostoucí koncentrací TDZ. Přidání BA způsobilo tvorbu kalusu. Nejlepší proliferace prýtů byla zaznamenána s 0,009 mg.L⁻¹ a 0,225 mg.L⁻¹ BA. Pouze kombinací TDZ s BA se ukázal růst prýtů. Tato studie ukázala, že TDZ je užitečné při mikropropagaci javoru klenu a autorka popsala, že optimální koncentrace TDZ se

pohybuje v rozmezí 0,011 – 0,0022 mg.L⁻¹ při mikropropagaci *Acer freemanni* a *Acer saccharinum*.

Lindén a Riikonen (2006) mikropropagovali javor mléč na WPM médiu a uvedli, že TDZ má velmi významný vliv na vývoj javorových prýtů. Počet nových prýtů byl podle nich silně ovlivněn koncentrací TDZ. Nejnižší koncentrace tohoto fytohormonu (0,0022 mg.L⁻¹ a 0,022 mg.L⁻¹) podporovala vývoj prýtů. Viditelné prodloužení prýtů bylo shledáno na 0,022 mg.L⁻¹ TDZ. Výsledky prokázaly, že TDZ má potenciální vliv na růst prýtů javoru mléče. Zjistilo se, že BAP má pozitivní účinky pouze bez přidání TDZ. Optimální koncentrace TDZ byla prokázána mezi 0,0022 a 0,022 mg.L⁻¹. Fernández-Lorenzo, Iglesias-Díaz and Gutiérrez-Araujo (2000) rovněž množili javory na WPM médiu. Také oni uvedli, že TDZ je vhodný pro založení kultury a multiplikaci prýtů v koncentraci 0,01 mg.L⁻¹.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, popsat a navrhnout metodiku rozmnožování javoru kleny (*Acer pseudoplatanus*) pomocí *in vitro* metod. V experimentu byly použity nodální segmenty s pupeny od jedince tohoto druhu, který roste v Arboretu FLD v Kostelci nad Černými Lesy.

Při zakládání kultury se jeví jako velmi obtížné zajistit správný výběr metody sterilizace. Obecně je u multiplikace problémem zajištění dostatečné sterility rostlinného materiálu po celou dobu provádění experimentu. Při přesazování v pracovním prostoru v laminárním boxu je potřeba dbát na pravidelné namáčení pracovních pomůcek v etanolu a jejich následném opálení nad kahanem. V tomto experimentu pro sterilizaci materiálu byl vybrán 0,05% roztok chloridu rtuťnatého, který se neukázal jako příliš účinný, protože většina zavedených explantátů zkontaminovala a byla napadena plísní, a proto je vhodné zabývat se i jinými metodami sterilizace, či zavést důkladnější sterilizaci, např. zvolit víceprocentní roztok HgCl_2 anebo sterilizovat materiál po delší dobu. Při dalších pokusech bych doporučila zkusit pro sterilizaci materiálu chlornan sodný (1 %) po dobu až 10 minut.

Dalším obtížným prvkem je správné zvolení kultivačního média s přidáním nejvhodnějších koncentrací cytokininů, které zajistí zmnožení prýtlů. Zdá se také nelehké rozmnožit dospělé, než – li např. semenáčky. V tomto výzkumu fáze iniciace probíhala na MS a WPM médiu s různými koncentracemi TDZ, BAP, KIN a ZEA. V tomto experimentu jenom malé procento explantátů iniciovalo. Pouze pár jedinců prosperovalo na WPM médiu s fytohormonem TDZ ze všech 271 založených explantátů. Při rozmnožování javorů bych chtěla doporučit zabývat se dalšími médii, např. DKW médiem. Další výzkum směřovat na použití TDZ v různých koncentracích a také sledovat vývoj explantátů při použití kombinací cytokininů a auxinů.

7 Seznam použitých zdrojů

Ali, A., T. Ahmad, N.A. Abbasi and I.A. Hafiz. (2009). Effect of different media and growth regulators on *In vitro* shoot proliferation of olive cultivar “Moraiolo”. *Pak. J. Bot.*, 41: 783–795.

Badoni, A., Chauhan, J.S. (2010). *In Vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. ‘Kufri Himalini’. *Academia Arena*, 2(4): 24-27.

Bowen-O'Connor C.A., Hubstenberger J., Killough C., Van Leeuwen D.M., St. Hilaire R. (2007). *In vitro* propagation of *Acer grandidentatum* Nutt. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43(1): 40-50.

Brassard, N., Richer, C., Tousignant, D., Rioux, J. A. (2003). Multiplication végétative de l’*Acer saccharum*. Contribution à la micropropagation. *Can. J. For. Res.* 33: 682–690.

Burnie, G. (2007). Botanika: ilustrovaný abecední atlas 10 000 zahradních rostlin s návodem, jak je pěstovat. 1. vyd. Praha: Slovart. ISBN 978-80-7209-936-8.

Driver, J. A.; Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox Walnut Rootstock, *Juglans hindsii* X *Juglans regia*, tissue culture. *HortScience*. 19(4): 507–509.

Řurkovič, J. (1996). *In vitro* regeneration of Norway maple (*Acer platanoides* L.). *Biologia Plantarum*. 38(2): 303-307.

Fernández-Lorenzo J.L., Iglesias-Díaz M.I., Gutiérrez-Araujo O. (2000). Micropropagation of a selected rootstock of *Acer palmatum*. *Acta Horticulturae*, 536: 347-353.

George E. F., Klerk G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro – and micro – nutrients. *In*: George E. F., Hall M. A., De Klerk G-J. (Eds). *Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Volume 1. The background*, Springer: 65-113.

Hradilík, J. (2005). *Rostlinné explantáty*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-915-7.

Hurych, V. (2003). *Okrasné dřeviny pro zahrady a parky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Květ. ISBN 80-85362-46-5.

Chalupa, V. (1984). Vegetativní množení dubu *Quercus robur* L., lípy *Tilia cordata* Mill. a jeřábu *Sorbus aucuparia* L. *in vitro*. *Lesnictví*, 30: 1019-1028.

Chalupa, V. (2000). Růst lesních stromů vypěstovaných *in vitro* z orgánových kultur a ze somatických embryí. *Lesnická práce* 79: 498-501.

Chalupa, V. (2001). Zachování genových zdrojů ušlechtilých listnáčů a jejich rozmnožování metodami *in vitro*. *Lesnická práce: časopis pro lesnickou vědu a praxi*. *Lesnická práce: Kostelec nad Černými lesy*, 80(12), 555-557. ISSN 0322-9254.

Chloupek, O. (2008). *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 3., upr. 2. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1566-2.

Kincl, L., Kincl, M. a Jakrlová J. (2006). *Biologie rostlin: pro 1. ročník gymnázií*. 4., přeprac. vyd. Praha: Fortuna. ISBN 80-7168-947-5.

Klock, P. (2002). *Roubování: ovocné a okrasné dřeviny, přenosné dřeviny*. Čestlice: Rebo Productions. *Zahrada plus*. ISBN 80-7234-238-X.

Kobliha, J. (2000). Explantátové kultury – historický předěl pro rozvoj klonového hospodářství lesních dřevin. *Explantat cultures – a historical turning-point for development of the clonal management of forest trees*. *Lesnická práce*, 79, 6: 272–273.

Koblížek, J. (2006). Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. 2., rozš. vyd. Tišnov: Sursum. ISBN 80-7323-117-4.

Kováč, J. (1992). Explantátové kultury rostlin. První vydání. Pedagogická fakulta Ústí nad Labem. ISBN 80-7044-036-8

Lindén L., Riikonen A. (2006). Effects of 6-benzylaminopurine, thidiazuron and type of explant on *in vitro* shoot development of *Acer platanoides* L. Propagation of Ornamental Plants, 6(4): 201-204

Linsmaier, E. M.; Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 18: 100–127.

Lloyd, G.; McCown, B (1980). Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Intl Plant Prop. Soc.* 30: 421–427.

Luštinec, J., Žárský V. (2003). Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0563-5.

Mahesh, S. (2009). *Plant Molecular Biotechnology*. Tunbridge Wells: New Age Science. ISBN 978-1-906574-14-7.

Malá, J. (2010). Biotechnologie v lesním hospodářství a šlechtění. *Lesnická práce*. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, 89(8), 17-19. ISSN 0322-9254.

Mok, M. C. (1994). Cytokinins and plant development – An Overview. In: Mok, D. W. S, Mok, M. C. (eds) *Cytokinins. Chemistry, activity and function*, CRC Press, Boca Raton: 155–166.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Novák, J., Skalický M. (2017). Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. Čtvrté vydání. Praha: Powerprint. ISBN 978-80-7568-036-5.

Paquereau-Trapy F., Guern J. (1983). Influence of temperature on growth yield and distribution of 2,4-D molecules between *Acer pseudoplatanus* cells and their culture medium. *Physiol Veg* 21: 197-204

Petrů, E., Řetovský, R. (1956). Rostlinné explantáty. ČSAV Praha.

Pollard, J. W., Walker J. M. (1990). *Methods in Molecular Biology: Plant Cell and Tissue Culture*. Clifton, New Jersey: Humana Press. Volume 6. ISBN 0-89603-161-1.

Procházka, S., Šebánek J. a kol. (1997). Regulátory rostlinného růstu. Praha: Academia. ISBN 80-200-0597-8.

Slavíková, Z. (2002). *Morfologie rostlin*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0327-6.

Šedivá, J. (2009). Influence of explant type, sucrose and IBA on *in vitro* growth of *Acer platanoides* L. 'Jirka'. *Acta Horticulturae*. 812: 185-188.

Šindelář, J. (2000). Význam a možnosti využití javorů (*Acer spec.*) v pěstební praxi lesního hospodářství České republiky. Praha – Zbraslav nad Vltavou: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti Jíloviště-Strnady.

Šmarda, J. (2003). *Genetika pro gymnázia*. Praha: Fortuna. ISBN 80-7168-851-7.

Štursa, J. (2016). Dřeviny: opadavé i stálezelené v ilustracích Věry Ničové. Ilustroval Věra NIČOVÁ. Praha: Aventinum. Artia (Aventinum). ISBN 978-80-7442-082-5.

Úradníček, L., Maděra, P. a kol. (2001). Dřeviny České republiky. Písek: Matice lesnická. ISBN 80-86271-09-9.

Van Sambeek J. W., Preece J. E. (2007). *In vitro* propagation of Fraxinus species. In: Jain S. M., Haggman H. (Eds). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Amsterdam, The Netherlands: Springer: 179–192.

Vermeulen, N. (1998). Encyklopedie stromů a keřů. Praha: Rebo Productions. ISBN 80-7234-007-7.

Větvička, V. (2001). Stromy a keře. 2. české vyd. Praha: Avicenum. Souborné svazky. ISBN 80-7151-178-1.

Vilkus, E. (2000). Rozmnožování ovocných a okrasných dřevin: základy školkařství. 2. nezm. vyd. Praha: Květ. ISBN 80-85362-32-5.

Walter, V. (1997). Rozmnožování okrasných stromů a keřů. Vyd. 2. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0268-6.

Wilhelm, E. (1999). Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 57-60.