



*Metodické listy OPVK*

# Využití moderních *in vitro* biotechnologií v ovocnářství



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## TEORETICKÉ ZÁKLADY *IN VITRO* KULTUR U OVOCNÝCH DRUHŮ

Ovocné druhy lze kromě přirozených polních podmínek pěstovat také v umělých laboratorních podmínkách. Jedná se zejména o kultivaci za specifických podmínek v uzavřených nejčastěji skleněných nádobách ve speciálně upravených kultivačních místnostech. Pro tyto kultury se proto nejčastěji používá název kultury *in vitro* (tedy ve skle). V dnešní době se kromě skleněných nádob používají také nádoby z průhledných plastů.

Dalším používaným názvem jsou kultury rostlinných explantátů. Na rozdíl od polních podmínek umožňují kultury *in vitro* kromě pěstování celistvých rostlin i pěstování jejich oddělených částí. Části rostlin odebrané za účelem *in vitro* kultivace se nazývají explantáty. Explantátem mohou být vegetativní i generativní orgány a to diferencovaná pletiva, nediferencovaná pletiva (nejčastěji ve formě kalusu) i jednotlivé izolované buňky a protoplasty. U rostlin jsou somatické buňky totipotentní a je v nich tak obsažena celá genetická informace pro vývoj kompletního organismu. Za vhodně nastavených a kontrolovaných *in vitro* podmínek lze morfogenetické procesy u explantátů zakončit kompletní regenerací celé rostliny. Pro odvození explantátové kultury je tedy vhodné jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkční genetickou informací obsaženou nejčastěji v jádře. Na rostliny ovocných druhů, které jsou pěstovány ve sterilním prostředí, nepůsobí, s výjimkou virů a fytoplazem, žádné jiné organizmy (především houby a bakterie).

### Nároky na technické a materiální vybavení pro produkci *in vitro* kultur

Pro systém k produkci výchozích *in vitro* rostlin je třeba mít k dispozici vhodně vybavenou chemickou laboratoř obsahující minimálně analytické váhy, přesné váhy, pH-metr, laboratorní míchačku, chladničku a mikrovlnnou troubu. Pro sterilizaci roztoků a agarových pěstebních médií je nutné mít k dispozici sterilizační zařízení dosahující teploty nejméně 120 °C (například parní tlakový autokláv). Pro sterilizaci pracovních nástrojů (skalpely, pinzety) je vhodná horkovzdušná sušárna, která využívá působení suchého horkého vzduchu při stanovených parametrech teploty a času.



Horkovzdušná sušárna a magnetické míchadlo



Flow boxy pro práci v aseptickém prostředí

Dále je doporučováno zařízení pro přípravu demineralizované vody reverzní osmózou, případně elektrodestilací. Tato voda slouží pro přípravu kultivačních, agarem zpevněných, půd. Pro růst *in vitro* kultur je nutná kultivační místnost s řízenou teplotou a osvětlením. Pasážování a následný přenos *in vitro* rostlin na čerstvá média je nutno provádět v aseptickém prostředí „flow boxu“ s proudícím filtrovaným vzduchem. Flow box umožňuje zachovat materiál sterilní při manipulaci (pasážování) mimo kultivační nádobu.

Pro přípravu zásobních roztoků a médií jsou nutné odměrné válce, odměrné baňky, Erlenmeyerovy baňky, kádinky, pipety, stříčky, míchadla, injekční stříkačky, antibakteriální mikrofiltry atd.



Odměrné baňky s připravenými zásobními roztoky, antibakteriální mikrofiltry

Erlenmeyerovy baňky a sklenice uzavíratelné transparentním víčkem



Pro práci se sterilním rostlinným materiálem jsou nutné skalpely, pinzety, skleněné petriho misky, nůžky a hliníkové fólie. Jako kultivační nádoby používáme především Erlenmeyerovy baňky (100 až 250 ml), sklenice uzavíratelné sterilizovatelným transparentním víčkem nebo pro účely *in vitro* kultivace speciálně vyvinuté plastové nádoby.

Kryolaboratoř musí být vybavena vakuově izolovanými nádobami pro skladování a manipulaci s kapalným dusíkem (Dewarovy nádoby) a programovatelným zamrazovacím zařízením. Vhodný je rovněž diferenční skenovací kalorimetr (DSC). Nezbytná je důkladná klimatizace kryolaboratoře vzhledem k riziku vytěsnění kyslíku z atmosféry místností odpařujícím se dusíkem.

### **Působení regulátorů růstu-fytohormonů u jednotlivých ovocných druhů a odrůd**

Rostlinný hormon (=fytohormon) je organická sloučenina, které je vytvářena samotnou rostlinou v jedné její části a poté přemísťována do části jiné, kde vyvolává určitou fyziologickou reakci. Přirozené i syntetické regulátory růstu mohou na rostlinu působit stimulačně nebo inhibičně. V praxi při *in vitro* kultivaci rostlin využíváme právě tyto regulátory růstu (RR), abychom docílili např. tvorby kořenů, organogenezi, prodlužujícího růstu nebo pro multiplikaci rostlin v umělých podmínkách laboratoře. Mezi základní a nejčastěji používané RR při kultivaci rostlin v podmínkách *in vitro* patří auxiny, cytokininy, gibereliny, dále kyselina abscisová a etylén.

### **Auxiny a jejich praktické využití**

Auxin je syntetizován v apexu, mladých listech, orgánech, vyvíjejících se plodech a semenech. Jeho obsah je vysoký hlavně u mladých, intenzivně rostoucích orgánů a stářím klesá. V xylému je hladina auxinů velmi nízká. Auxin má zásadní význam pro organogenezi a utváření rostlin a udržuje polaritu rostlin. Ovlivňuje větvení nadzemích i podzemních částí rostlin. Auxin je zodpovědný za apikální dominanci. V laboratorní praxi se využívá pro stimulaci zakořeňování řízků, při probírce květů nebo jako herbicid. Z vnějších faktorů ovlivňujících auxin je nejdůležitější světlo (kvalita, intenzita, doba působení, fotoperioda). Připravené médium s obsahem auxinů by mělo být uchováno na temném místě.

Mezi přirozené auxiny patří: kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlor-IAA, kyselina fenylloctová (PAA).

Syntetické auxiny pak mohou být rozděleny do pěti skupin: Indolové kyseliny: Kyselina indol-3-propiová (IPA), Naftalenové kyseliny: Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA) a  $\beta$ -naftyloctová (NOA), Chlorfenoxkykyseliny: 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T), 2-metyl-4-

-chlorfenoxyoctová (MCPA), Benzoové kyseliny: Kyselina 2,4,6- a 2,4,5-trichlorbenzoová, dicamba, Deriváty kyseliny pikolinové: Picloram

### **Cytokininy a jejich praktické využití**

Cytokininy jsou důležité pro hormonální regulaci dělení buněk explantátových a buněčných kultur, ale i ve vrcholech stonku u celistvých rostlin. Má opačný účinek jako auxin – snižuje apikální dominanci a způsobuje větvení rostlin. Podporuje vegetativní růst a zpomaluje stárnutí. Spolu s auxinem umožňují regeneraci rostlin v explantátových kulturách. Dnes je známo přes 30 přirozených cytokininů, z nichž nejznámější je kinetin (6-furfylaminopurin) a zeatin. Mezi využívané syntetické cytokininy patří benzylaminopurin (BAP) a isopentenyladenin (2iP). Cytokinin se tedy využívá především jako složka kultivačních médií pro multiplikaci rostlinného materiálu.

### **Gibereliny a jejich praktické využití**

Byly objeveny a pojmenovány po houbové chorobě rýže *bakanae* – *Gibberella fujikuroi*. Gibereliny jsou skupinou fytohormonů, které mají mnoho funkcí v regulaci ontogeneze. Ovlivňují dlouhivý růst, klíčení semen, nástup kvetení, podílí se při determinaci pohlaví, regulují vývoj plodů. Jsou syntetizovány všemi rostlinnými orgány, nejvíce v místech aktivního růstu, v pupenech, semenech a u nově se tvořících orgánů. Využívána je giberelin GA<sub>3</sub> (kyselina giberelová), GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>. V zemědělské praxi jsou využívány pro stimulaci a úpravu morfologie plodů (např. ovocnářství-zvýšení nasazení plodů).



## Somaklonální variabilita

Za somaklonální variabilitu považujeme fenotypovou variabilitu genetického nebo epigenetického původu, která se projevuje vysokým výskytem odchylek od původního fenotypu. K častějšímu vzniku somaklonální variability dochází u rostlin vystavených stresu, tedy i u rostlin odvozených z buněčných kultur *in vitro*. Genetická variabilita je spojena s mutagenezí. Změny se mohou projevit v podobě ploidii, multiplikace genu, změn uspořádání genů, rozsáhlých i bodových mutací. Genetická variabilita je problémem při standardním množení rostlin, uchovávání genových zdrojů a podobně. Na druhou stranu je přínosem při explantátovém šlechtění rostlin. Ke změnám fenotypu dochází také na úrovni epigenetické. Tyto změny ovšem po navrácení rostlin do původních podmínek postupně vymizí a rostlina se navrací k původnímu fenotypu.

## Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je typ vegetativního množení rostlin, kdy vzniká embryo nebo úplná rostlina z jiné buňky, než z oplozeného vajíčka (zygoty). Somatická embrya jsou morfologicky i fyziologicky srovnatelná se zygotickým embryem. Embryo si přitom nese základ stonku i kořene. Tento způsob množení má obrovský koeficient (např. z 1 gramu kalusu až 500 somatických embryí za měsíc) a je prakticky využíván asi u 150 rostlinných druhů.

## Makro a mikro prvky

Makroprvky a mikroprvky tvoří anorganickou složku umělých živných půd (médií), která je nezbytná pro růst a vývoj rostlinného materiálu. Rostliny přijímají tyto prvky z média ve formě iontů a do média jsou přidávány ve formě solí. Jejich příjem rostlinami z média je ovlivněn koncentrací jiných elementů, pH, teplotou rostlinnou tkání. Část mikro a makro prvků je obsažena také v agaru. K makroelementům je řazen dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra, z mikroelementů využívaných pro *in vitro* kultivaci rostlin je to železo (fyziologicky makroelement), mangan, zinek, bór, měď, kobalt, molybden. Mnoho z těchto prvků může být obsaženo ve směsích pro přípravu živných půd vyráběných komerčními firmami, což samotnou přípravu v laboratoři usnadňuje a zrychluje. Samostatná aplikace je pak formou připravených zásobních roztoků směsí mikroprvků nebo makroprvků nebo jednotlivých elementů

## Zdroje energie - sacharidy

Rostlinný materiál kultivovaný v podmínkách *in vitro* potřebuje ke svému růstu a vývoji energii. Jako zdroj této energie nejčastěji slouží sacharóza. Sacharóza inhibuje tvorbu chlorofylu a fotosyntézu a rostliny přechází na heterotrofní způsob výživy. Kromě toho také upravuje osmotickou hodnotu média. Při výskytu infekcí je to pak hlavně sacharóza, která nárůst těchto infekcí zvyšuje. Koncentrace sacharózy je nejčastěji 2–4% (tzn. např. 30 g sacharózy na litr média). Sacharóza může být v některých případech nahrazena cukry jinými, jako jsou glukóza, fruktóza, rafinóza, maltóza, laktóza, kukuřičný sirup, mannitol, sorbitol aj.

## Zpevňující složka v médiu - typ a kvalita agaru

Média pro kultivaci rostlin *in vitro* mohou být připravována jako pevná nebo tekutá. Tuhá konzistence média je způsobena nejčastěji přidávkem agaru. Pro běžnou kultivaci rostlin se používá 5–7 g agaru na litr média. Agar je nehomogenní směs polysacharidů, která bývá připravována z červených mořských řas (např. rody *Gelidium*, *Acanthopeltis*, *Ceramium*, *Pterocladia*, *Gracilaria*). Agar obsahuje také malé množství makro a mikro elementů (hl. Ca, Na, K, P), cukry, aminokyseliny, vitamíny. K dostání jsou agary v různých stupních čistoty, stopových elementů, pH nebo teplotou, při které agar vytváří gelovou konzistenci. Např. vláknitý agar je nutné před použitím upravit, jiné agary, dodávané v práškové formě, již žádné úpravy nepotřebují. Agar je nejčastěji využívaná látka pro zpevnění média, mohou být využity i jiné látky.



Agar ve formě prášku



## Praktická příprava kultivačních médií

Médium, neboli také umělá živná půda dodává explantátům vše pro jejich výživu, růst a vývoj a jeho složení bývá jedním z nejdůležitějších faktorů úspěšné kultivace. Výběr média závisí nejen na rostlinném druhu, ale také explantátu (části rostliny, které je kultivována). Součástí média bývá zdroj uhlíku a energie (např. sacharóza), zpevňující látka (agar), makro a mikro elementy, vitamíny, aminokyseliny, aktivní uhlí, nedefinované organické složky (např. kokosové mléko, extrakty z banánů), růstové regulátory, antibiotika a další látky. Příprava živných půd může být různá.

**Příklad na přípravu jednoho litru tuhého média.** Medium může být připraveno studenou cestou: Do asi 300 ml destilované vody přidáme agar (6 g) a postupně jsou přidány makroelementy, mikroelementy, železo, vitamíny a sacharóza (30 g), regulátory růstu, případně další komponenty (např. aktivní uhlí). Do litru doplníme destilovanou vodou. Konečné pH (dle kultury, pro které je médium připravováno) je upraveno buď 5% NaOH nebo 1M roztok HCl. Médium je rozléváno do kultivačních nádob. Takto namíchané médium je připraveno na sterilizaci v autoklávu při 120 C° po dobu 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu je médium při pokojové teplotě uskladněno v temnu.

Různé druhy  
kultivačních médií



## Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky slouží k tomu, abychom nemuseli při každé přípravě média navažovat a rozpouštět jednotlivé komponenty média. Toho lze využít např. při přípravě roztoků mikro a makro prvků, vitamínů nebo růstových regulátorů. Jednotlivé komponenty nebo jejich směsi jsou ukládány dlouhodobě většinou v práškové formě a suchu a temnu při pokojové teplotě, některé v chladničce. Kapalně zásobní roztoky jsou naopak uloženy v chladničce a pouze na omezenou dobu. Tyto roztoky jsou míchány tak, že si připravíme základní navážku látky, kterou chceme mít ve formě zásobního roztoku (určité koncentrace) a rozpustíme ji v malém množství vody, případně v alkoholu, zásadě nebo kyselině. Směs je připravována do odměrných baněk, které jsou doplněny destilovanou vodou pro žádaný objem a zásobní roztoky jsou v nich také uchovávány. Pro uchování zásobních roztoků mohou být používány také jiné skleněné nádoby. Zásobní roztoky jsou poté uloženy a skladovány v chladničce.



Zásobní roztoky



Chemikálie pro přípravu médií a zásobních roztoků

## Praktické výhody využití *in vitro* kultur

Výhody kultivace rostlin *in vitro* spočívají hlavně ve vysokém množitelenském koeficientu a rychlosti multiplikace. Jedním z největších přínosů mikropropagace je množení a produkce zdravého rostlinného materiálu (bez virů, fytoplazem, bakterií). Rostlinný materiál produkovaný *in vitro* také vykazuje uniformitu růstu, neboť multiplikuje vegetativní cestou (v podstatě se jedná o produkci klonů). Praktickou výhodou je také značná úspora plochy. Kultivace rostlinného materiálu *in vitro* můžeme celý rok bez ohledu na roční dobu či počasí. V laboratoři vytváříme umělé podmínky (teplo, světlo, vlhkost) a tyto podmínky můžeme kdykoliv regulovat. Prakticky se tedy *in vitro* kultivace využívá v první řadě pro množení rostlinného materiálu. Dalším důležitým využitím je eliminace rostlinných patogenů a to zejména virových chorob. *In vitro* kultivace rostlin je také problematika, která je spojena se šlechtěním rostlin. *In vitro* kultivace je také hojně využíváno pro vědecké účely, například v experimentální biologii (např. zjištění vlivu těžkých kovů na rostlinné druhy, koncentrace fytohormonů a různých látek na rostlinu, GMO,...). Další využití rostlinných explantátů je pro produkci látek průmyslově nebo farmaceuticky využitelných (sekundární metabolity- vonné látky, silice, pigmenty, sladidla, látky farmaceuticky významné, látky s antimikrobiální aktivitou).



Rostlinné druhy kultivované *in vitro* (a-d)

## ZALOŽENÍ IN VITRO KULTURY - STERILIZACE VÝCHOZÍHO EXPLANTÁTU

### Založení *in vitro* kultury - sterilizace výchozího explantátu

#### 1) Rostlinný materiál

Pro uchování odrudové stability doporučujeme zakládat *in vitro* kultury z vegetačních vrcholů zpravidla větších než 0,2 mm. V průběhu jednotlivých subkultivací pak vedeme tyto kultury na pevném agarovém médiu ve formě aktivně rostoucích mnohonásobných prýtů s dobře diferencovaným růstovým vrcholem. K účelům praktického *in vitro* množení nedoporučujeme využívat méně organizované kalusové nebo buněčné kultury menší než 0,1 mm vzhledem k riziku chromozomální a genetické nestability. Při založení kultury je možno využít dormantní výhony odebrané v zimních měsících nebo v předjaří v době vegetačního klidu (leden až březen) přímo z polních podmínek z rostlin ověřených z hlediska odrudové pravosti. Takto odebrané dormantní výhony se následně nechají narašit v laboratorních podmínkách při pokojové teplotě. Pro snadnější ustavení *in vitro* kultury lze také založit matečnicí z odrud vybraných pro ozdravování, které naroubujeme v izolovaném skleníku na bezvirózní podnože. Tímto vytvoříme depozitář primárních zdrojů v technické izolaci. Rostliny ve skleníku nejsou vystaveny v takové míře působení mikroorganismů (bakterií a hub) rozšířených v polních výsadbách, což usnadňuje sterilizaci a ustavení počátečních explantátů. Úspěšnost sterilizace je úměrná co nejnižší výchozí hladině kontaminace. Kromě období vegetačního klidu lze odebírat a vypreparovat aktivně rostoucí růstové vrcholy v případě potřeby i přímo z polních podmínek nejlépe na počátku vegetace (od poloviny dubna do poloviny června) v období intenzivního prodlužovacího růstu.

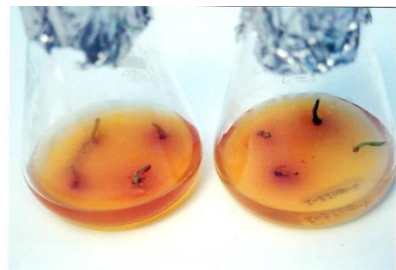
## 2) Sterilizace

Při zakládání *in vitro* kultury výhony promyjeme pod čistou tekoucí vodou. Tím dojde k odstranění části mikrobiální flóry, která přežívá na povrchu výhonů ve venkovních podmínkách a následně způsobuje kontaminace po založení *in vitro* kultury. Po provedení šikmého řezu na spodní straně ponoříme výhony do vody a necháme je rašit 2 až 3 týdny při pokojové teplotě. Z rašících vegetačních pupenů s diferencovaným růstovým vrcholem vypreparujeme ve sterilním prostředí flow boxu vrcholy o velikosti 5 – 10 mm. Tím dojde k odstranění šupin pupenů, částí listů a jiných povrchových struktur bránících sterilizaci. Vrcholy je rovněž možno vypreparovat pod stereoskopickým mikroskopem.

Jako sterilizační činidlo pro sterilizaci primárního rostlinného explantátu lze využít různé chemické prostředky v různých koncentracích (chlorid rtuťnatý, chlornan sodný 0,5%, etanol 70%) s přídatkem smáčedla. Na základě našich výsledků doporučujeme jako sterilizační činidlo chlorid rtuťnatý (pozor – silně toxický) v koncentraci 0,15 % se sterilizační dobou jedna minuta. Jako smáčedlo lze použít Tween 20 nebo i několik kapek běžně užívaných komerčně vyráběných prostředků na mytí nádobí (Jar). Smáčedlo je důležité, protože umožňuje snazší proniknutí sterilizačního činidla do potenciálně kontaminované oblasti, například mezi jen částečně rozvinuté listy výchozího explantátu. Zbytky sterilizačního činidla po skončení sterilizace z explantátů opláchneme sterilní destilovanou vodou. Počáteční explantáty nasadíme po ukončení sterilizační procedury na pevné agarové médium. Pro odhalení případných kontaminací nežádoucími mikroorganismy je nutné *in vitro* kultury vizuálně sledovat nejméně po dobu jednoho měsíce.



*In vitro* kultura hrušně 'Lucasova' po jednom měsíci od nasazení na médium.



Hnědnutí explantátů jabloně a média v jejich okolí, způsobené oxidací fenolických látek

Všechny kontaminované kultury je nutno vyřadit a zlikvidovat. Nekontaminované explantáty přeneseme na médium pro prorůstání a množení. Ve srovnání s jinými druhy ovocných plodin bylo zejména u jabloní v pokusech prováděných ve VŠÚO Holovousy s.r.o. zaznamenáno po sterilizaci silnější hnědnutí explantátů a média v jejich okolí. Hnědnutí je způsobeno nadprodukcí a následnou oxidací fenolických látek vytékajících z řezných ran na povrchu explantátu. Oxidací vznikají fytotoxické substance, které mohou mít za následek odumírání i nekontaminovaných explantátů. Pro omezení hnědnutí zejména u jabloně se v našich pokusech osvědčilo přenesení výchozích explantátů na čerstvé médium po dvou dnech kultivace. Další možností je přidávání antioxidantů (např. kyselina askorbová) do kultivačních médií při nasazení počátečního explantátu.

Vyhodnocení povrchové sterilizace pomocí 0,15% HgCl<sub>2</sub>.

Odrůda	Kontaminované explantáty		Explantáty uhynulé bez kontaminace		Explantáty, jež vyvinuly výhony	
	Počet	(%)	Počet	(%)	Počet	(%)
Jabloně						
Clijo	1	2,5	0	0,0	39	97,5
Fragranc	6	15,0	1	2,5	33	82,5
Hrušeň						
Dita	3	7,5	0	0,0	37	92,5
Omega	1	2,5	1	2,5	38	95,0
Třešeň						
Amid	5	12,5	0	0	35	87,5
Marta	1	2,5	21	52,5	18	45,0

U odrůd bylo sterilizováno 40 výchozích explantátů.





### 3) Kontaminace a využití antibiotik v počáteční fázi *in vitro* kultury

V *in vitro* kultuře se mohou během následného pasážování objevit zpočátku skryté mikrobiální kontaminace. Cizí mikroorganismy se mohou do *in vitro* kultur dostat buď z povrchu nasazovaných rostlinných explantátů, z jejich pletiv, nebo při práci v laboratoři z vnějšího prostředí či náradí. Seznam mikroorganismů, dosud popsanych a determinovaných jako kontaminanty v kulturách *in vitro*, zahrnuje nejen bakterie a houby, ale i viry a příbuzné organizmy nebo dokonce roztoče a třásněnky. Kontaminace bakteriemi jsou považovány za nejzávažnější a byla jim též věnována největší pozornost. Výskyt bělavých, často rozptýlených kroužků nebo drobných žlutých, později splývajících kolonií v médiu i na povrchu média kolem explantátů je nejnápadnějším symptomem bakteriální infekce. Na pracovišti VŠÚO Holovousy s.r.o. byly provedeny izolace bakterií vyskytující se jako nejčastější kontaminace v kultuře *in vitro*. Tyto bakterie byly ve spolupráci s pracovištěm České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně determinovány na úroveň rodu případně druhu. Na pracovišti VŠÚO Holovousy s.r.o. byly nalezeny následující typy kontaminací: *Xanthomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Bacillus amyloliquefaciens*

Z velké škály testovaných látek se ukazuje jako vhodný pro použití v *in vitro* kultrách rostlin cefotaxim z podskupiny  $\beta$ -laktamových antibiotik. Tato antibiotika inhibují syntézu buněčných stěn u dělicích se bakterií a působí jejich rozpad. Cefotaxim začal být používán v osmdesátých letech, především k eliminaci *Agrobacterium tumefaciens* při transformačních pokusech na rostlinách. Zatím je jedním z nejužívanějších antibiotik v transformačních postupech nebo při somatické embryogenezi u nejrůznějších druhů rostlin. Je účinný především na gramnegativní bakterie. K přímému omezení kontaminací v kulturách *in vitro* u ovocných plodin byl cefotaxim ověřen u jabloní, révy vinné, odrůd slivoní nebo u jahodníku. V pokusech s transformací nebo regenerací ovocných plodin byl využit kromě toho také u jabloní, ostružníku, ořešáku, mandloní, slivoňových podnoží a meruněk.

Vzhledem k termolabilitě většiny antibiotik je nutno tyto látky přidávat do média přes antibakteriální mikrofiltry (například Acrodisc Syringe 0,2  $\mu$ m). Multiplikační médium se při tom autoklavuje po menších částech ve velkých úzkohrdlých baňkách uzavřených pevně alobalem. Po částečném zchlazení média na cca 40 °C se do každé baňky vpraví injekční stříkačkou přes mikrobiální filtr alikvotní část antibiotika, rozpuštěného ve sterilní vodě. Baňku je nutno důkladně protřepat a ve sterilním flow boxu se pomocí sterilizovaných kádinek médium rozlévá do předem sterilizovaných kultivačních nádob.

Charakteristika izolátů nalezených v laboratorní praxi na pracovišti VŠÚO Holovousy s.r.o.:

*Xanthomonas sp.*: gramnegativní tyčinkovité, v nepravidelných shlucích. Na MPA s glukózou jsou matné vypouklé, se souvislým okrajem, 2-3 mm v průměru, se žlutým pigmentem. Pozitivní výsledky – kataláza, růst při 37 °C, hydrolýza Tweenu 80, eskulinu a ONPG, kyselina z xylózy a maltózy, oxidáza, fosfatáza. Negativní výsledky: kyselina z glukózy oxidativně, kyselina z glukózy fermentativně, produkce fluoresceinu, růst při 42 °C, arginin dihydroláza, Simmons citrát, acetamid, redukce nitrátů a nitritů, hydrolýza želatiny, škrobu, kaseinu a lecithinu, dekarboxylace lysinu a ornitinu, kyselina z mannitolu a fruktózy, produkce indolu, růst v přítomnosti 6,5 % NaCl, produkce sirovodíku. Citlivost na ATB nebyla stanovena, protože kmen neroste na M-H agaru.

*Bacillus sp.*: gramlabilní, tyčinkovité, jednotlivé, v nepravidelných shlucích, spóry oválné, nezduřují buňku, umístěné centrálně. Morfologie na MPA : kulaté, hladké, lesklé, ploché, kraj souvislý, 2 – 4 mm v průměru. Pozitivní výsledky : kataláza, anaerobní růst, hydrolýza želatiny, škrobu, eskulinu a ONPG, kyselina z glukózy, mannitolu, celobiózy, laktózy a fruktózy. Negativní výsledky: hydrolýza Tweenu 80, kaseinu, tyrosinu, DNA a lecithinu, ureáza, acetoin, redukce nitrátů, kyselina z xylózy a inositolu, růst v přítomnosti 10 % NaCl, růst při 50 °C. Citlivost na ATB: citlivé k erytromycinu, cefalotinu, vankomycinu a piperacilinu, rezistentní ke klindamycinu, intermediální ke chloramfenikolu a tetracyklinu.

*Bacillus amyloliquefaciens* : grampozitivní tyčinky, po dvou, v palisádách, spóry oválné, nezduřující buňku, umístěné excentricky. Morfologie na MPA: kulaté, hladké, lesklé, ploché, okraj souvislý, průměr 2 – 4 mm. Pozitivní výsledky: kataláza, hydrolýza želatiny, škrobu, eskulinu, ONPG a DNA, kyselina z glukózy, mannitolu, celobiózy, laktózy a fruktózy, fosfatáza. Negativní výsledky: anaerobní růst, hydrolýza Tweenu 80, tyrosinu a lecithinu, ureáza, acetoin, redukce nitrátů, kyselina





z xylózy a inositolu, růst v přítomnosti 10 % NaCl, růst při 50 °C, Simmons citrát, arginin dihydroláza. Citlivost na ATB: citlivé k erytromycinu, vankomycinu a piperacilinu. Rezistentní ke klindamycinu, intermediální k tetracyklinu.

## INDUKCE DĚLENÍ BUNĚK - MNOŽENÍ POMOCÍ CYTOKININŮ

Po sterilizační proceduře a ustavení nekontaminovaných výchozích explantátů probíhá fáze multiplikace na médiu s převahou fytohormonů cytokininů. V současnosti je známo kolem 30 přirozených cytokininů. Tyto látky jsou založeny převážně na struktuře substituovaného adeninu. Podle řetězce navázaného na dusík N6 adeninu je možno je dále rozčlenit na isoprenoidní (např. trans-zeatin atd..) a aromatické (6-benzylaminopurin, kinetin, topoliny aj.) Z aromatických cytokininů je pro *in vitro* množení ovocných druhů využíván hlavně benzylaminopurin (benzyladenin). Jako perspektivní pro indukci *in vitro* množení se jeví rovněž hydroxylované deriváty benzylaminopurinu topoliny (podle českého názvu topolu, odkud byly izolovány prof. Strnadem). Cytokininovou aktivitou se vyznačují také některé deriváty močoviny (např. thidiazuron). Cytokinininy jsou



*In vitro* kultura hrušně prorůstající na MS médiu s fytohormonem BAP



*In vitro* kultura hrušně prorůstající na MS médiu s fytohormonem TDZ. Viditelná je vysoká tvorba kalusu na bázi explantátů a ztlustlé

přirozenou cestou vytvářeny v rostlině hlavně v oblasti vrcholů kořenů. Fyziologický účinek cytokininu je závislý na druhu rostliny a použité koncentraci. Charakteristickým rysem těchto regulátorů růstu je jejich působení ve velmi nízkých koncentracích (mg/L). Cílem použití cytokininů ve fázi multiplikace *in vitro* kultury je stimulace buněčného dělení a tvorba nových prýtlů. Působením cytokininů dochází k potlačení apikální dominance a k podpoře vývoje axilárních pupenů v úžlabí listových základů v aktivně rostoucí prýty. Je potřeba si uvědomit, že přítomnost cytokininů v kultivačním médiu zároveň inhibuje tvorbu kořenů. Ve fázi multiplikace může dojít k výskytu nežádoucího jevu tzv. hyperhydratace neboli zvodnění výhonů. Řešením je snížení koncentrace použitých cytokininů nebo změna typu agaru. V tomto ohledu doporučujeme použití kvalitnějšího čistšího typu agaru. Při excesivní tvorbě kalusu na bázi explantátu doporučujeme rovněž snížení koncentrace použitých cytokininů. Při přidávání termolabilních látek fytohormonů nebo antibiotik do média využíváme bakteriální mikrofiltry.

V průběhu kultivace je vhodné zjistit koeficient multiplikace pro zjištění a porovnání schopnosti množení. Doporučujeme počítat koeficient množení jako průměrný počet nových výhonů na výchozí explantát po 1 měsíci růstu na agarovém médiu v kultivační místnosti. Dále doporučujeme vypočítat pro vyhodnocení přesnosti odhadu průměru základního souboru SE (Standard Error, směrodatná chyba) jako míru variance. V tabulce 2 je uveden příklad výsledku multiplikace u odrůd našich hlavních ovocných druhů jabloně, hrušně a třešně.

**Tabulka 1.** Koeficienty množení jednotlivých genotypů hrušně, jabloně a třešně na médiu s různými koncentracemi cytokininů.

Cytokinin (mg · l <sup>-1</sup> )	Jabloň		Hrušeň		Třešeň	
	Clijo	Fragrance	Dita	Omega	Amid	Marta
BAP						
1.0	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0 <sup>n</sup>	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
2.0	2,1 ± 0,1	4,9 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1 <sup>n</sup>	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1
4.0	2,6 ± 0,2 <sup>z</sup>	8,1 ± 0,4	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1 <sup>n</sup>	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1
TDZ						
0,5	2,1 ± 0,1 <sup>yz</sup>	2,4 ± 0,2	1,8 ± 0,1 <sup>yz</sup>	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0
1	4,5 ± 0,2 <sup>yz</sup>	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1 <sup>yz</sup>	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
2iP						
10	1,1 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0

y - vysoká tvorba kalusu na bázi explantátů  
z - ztlustlé výhony  
n - nekrózy

## INDUKCE TVORBY KOŘENŮ POMOCÍ AUXINŮ

Auxiny, jako regulátory růstu, hrají v rostlinném organismu důležitou úlohu při řízení dělení, prodlužování a diferenciaci buněk. Auxiny, ať už endogenní nebo exogenní, při dostatečné koncentraci působí na rostlinné buňky jako spouštěcí mechanismus pro diferenciaci a tvorbu primordií (zárodečných stádií) kořenů. Tato kořenová primordia se v podmínkách *in vitro* kultur diferencují z meristemických okrsků (růstových center) přibližně šestý den po vystavení rostlinného explantátu působení auxinu. Pro indukcii kořenů jsou využívány zejména IBA (kyselina beta indolylmásečná), IAA (kyselina beta indolylactová) a NAA (kyselina alfa naftyloctová). Z literatury je známo, že při kultivaci v podmínkách *in vitro* kultur může dojít v médiu k chemické reakci vedoucí ke konverzi auxinu IBA na auxin IAA a naopak. Přestože je prokázáno, že přidávek auxinů do kořenicích médií je základním předpokladem pro vznik a vývoj kořenů, může příliš vysoká koncentrace auxinů působit na formování kořenů inhibičně. Na místo vzniku kořenů dochází v tomto případě v bazálních částech *in vitro* explantátů k formování velkého množství kalusu. Nadměrné množství kalusu mezi bází rostliny a případnými kořeny vyvolané příliš vysokou koncentrací auxinů může znemožnit úspěšný převod do *ex vitro* podmínek. Vznik a formování kořenů je komplexní jev, který může být ovlivněn i dalšími chemickými látkami například fenoly nebo enzymy peroxidázami. Mezi jednotlivými genotypy ovocných plodin existují významné rozdíly ve schopnosti zakořeňování výhonů *in vitro* pěstovaných rostlin. Doporučujeme dodatečné přidávání auxinů až do hotového vysterilizovaného média přes bakteriální mikrofiltry. Připravená kultivační média obsahující auxiny je nutno skladovat v temnu, aby nedošlo k rozkladu účinných látek působením světla (zejména jeho ultrafialovou složkou) v procesu tzv. fotooxidace.



Kořenění třešně 'P-HL-A' v *in vitro* kultuře na MS médiu s přidávkem fytohormonu IBA (1 mg · l<sup>-1</sup>).

Po fázi kořenění jsou kořenicí rostliny ze sterilního prostředí *in vitro* kultur zpětně převedeny do běžných kultivačních podmínek do pěstebního substrátu ve skleníku nebo přímo do volné půdy. Aklimatizaci na *ex vitro* podmínky je nutno provádět postupně a to buď s použitím průhledných plastových krytů nebo miniskleníků s regulovatelným odvětráváním. Tak lze pozvolna snižovat vzdušnou vlhkost v okolí převáděných rostlin. Další možností je použití kultivačního boxu s možností regulace vlhkosti a osvětlení. Rostliny převedené po *in vitro* kultivaci do *ex vitro* podmínek je nutné po převodu do běžných kultivačních podmínek sledovat, protože různé faktory spojené se specifickými podmínkami *in vitro* kultury mohou ovlivnit genetickou stabilitu uchovávaného rostlinného materiálu.

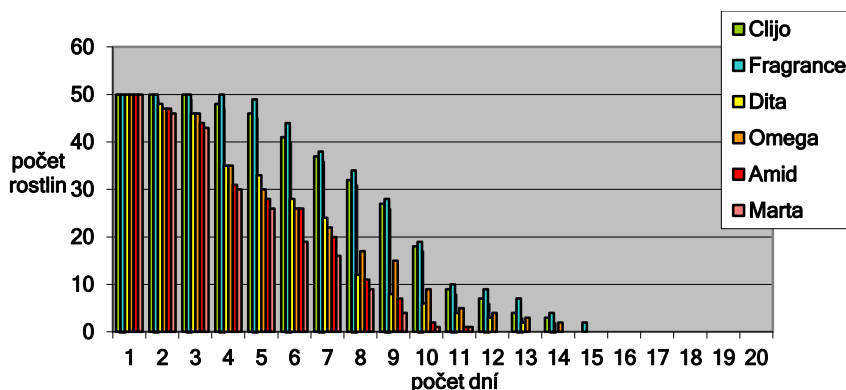
## OZDRAVOVÁNÍ POMOCÍ TERMOTERAPIE A CHEMOTERAPIE

### Ozdravování pomocí termoterapie

*In vitro* termoterapie je založena na pěstování rostlin ve vysoké teplotě (34–40 °C) po dobu několika dnů nebo týdnů. V této teplotě dochází k zastavení mnoha běžně se vyskytujících rostlinných virů. Dále vzhledem k nerovnoměrnému rozložení viru v rostlině a poklesu koncentrace směrem



Odumírání růstových vrcholů *in vitro* rostlin hrůšně při termoterapii v 39 °C.



Graf testování odolnosti *in vitro* pěstovaných rostlin v teplotě 39 °C.

k růstovému vrcholu lze předpokládat, že většina virů není schopna napadat nově

se tvořící apikální meristemické pletivo při vysoké teplotě. Metoda ozdravování pomocí kombinace termoterapie a *in vitro* kultur je založena na předpokladu, že vrcholy izolované v průběhu termoterapie a následně kultivované v podmínkách *in vitro* budou viruprosté. Přitom platí obecné pravidlo, že se zmenšující se velikostí výchozího explantátu stoupá pravděpodobnost odvození viruprostého jedince. Na druhou stranu však se zmenšující se velikostí klesá pravděpodobnost přežití a úspěšné regenerace izolovaného vegetačního vrcholu. Vysoká teplota přesahující 30 °C je dalším stresovým faktorem, vedoucím k odumírání rostlin většinou ještě během terapie. Z praktického hlediska doporučujeme na počátku ozdravování stanovit teplotní odolnosti *in vitro* rostlin ošetřovaných druhů a genotypů. Přitom se u jednotlivých odrůd hodnotí a v dané teplotě vzájemně porovnává rychlost odumírání růstových vrcholů. Cílem přitom je, aby při pobytu rostlin ve vysoké teplotě byla nalezena nejzazší možná doba odběru vrcholových meristémů, která by ovšem zároveň umožňovala přežití a regeneraci alespoň části odebraného rostlinného materiálu. Výsledky testování tepelné odolnosti *in vitro* pěstovaných rostlin při teplotách 39 °C u vybraných odrůd v jednom z pokusů prováděných ve VŠÚO Holovousy jsou uvedeny v grafu číslo 1.

Z grafu vyplývá, že při teplotě 39 °C odumřelo u všech studovaných druhů a odrůd do 11 dne kultivace více než 80 % *in vitro* vrcholů. Nejlépe snášely vysokou teplotu odrůdy jabloně 'Clijo' a 'Fragrance' a nejhůře odrůdy třešně 'Amid' a 'Marta'.



Ozdravování *in vitro* kultur třešně v jednom termoboxu společně s rostlinami zakořeněnými v kontejnerech

### Ozdravování pomocí chemoterapie

Jednou z účinných metod ozdravování rostlinného materiálu je aplikace chemických preparátů s virostatickými účinky. Chemickou látku s virostatickými účinky lze přidat do používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí antibakteriálních mikrofiltrů po autoklavování. Ozdravovaný rostlinný materiál je pak následně kultivován na médiu s virostatikem při obvyklé pěstební teplotě 22 až 26 °C v běžné kultivační místnosti. Nejčastěji používanou antivirovou látkou při ozdravování rostlinného materiálu je syntetický analog guanosinu ribavirin. Mechanismus působení ribavirinu je založen na inhibici replikace virů a zbrzdění systémového šíření virových částic v rostlině. Ribavirin je účinný zejména proti RNA virům, které mezi rostlinnými viry převažují. V našich pokusech se úspěšnost ozdravování chemoterapií významně lišila od 0 do 100 % v závislosti na genotypu, koncentraci antivirotika a infekci konkrétními virovými patogeny. Při chemoterapii byla ve VŠÚO Holovousy s.r.o. použita koncentrace ribavirinu v rozsahu 20 až 160 mg · l<sup>-1</sup> v kultivačním MS médiu. Nejlepší výsledek 100% ozdravení po prvním RT-PCR testování byl dosažen u odrůd hrušně 'Dita' a 'Omega' infikovaných jedním virem ASPV na médiu s 20 nebo 40 mg · l<sup>-1</sup> ribavirinu. Naopak nejhorší výsledek a nulové ozdravení byl zaznamenán na médiu s nižší koncentrací ribavirinu 20 mg · l<sup>-1</sup> v případě odrůdy jabloně 'Fragrance' infikované směsnou infekcí tří virů ACLSV, ASGV a ASPV. U této odrůdy infikované nejvyšším počtem virů musela být pro kompletní ozdravení chemoterapie provedena dvakrát, nejdříve na médiu s 20 mg · l<sup>-1</sup> ribavirinu a následně na médiu s vyšší koncentrací ribavirinu 100 mg · l<sup>-1</sup>. Jedním z problémů, který může vzniknout při aplikaci ribavirinu, je fytotoxicita této látky projevující se již při běžně používaných koncentracích v *in vitro* kulturách ozdravovaných druhů. Intenzita a projev fytotoxicity ribavirinu





se může u jednotlivých rostlinných druhů výrazně lišit. V našich pokusech se projevovale fyto toxicky (nekrózy, zastavení růstu) u odrůdy třešně 'Amid' již koncentrace ribavirinu  $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Naopak odrůda jabloně 'Fragrance' byla schopna tolerovat ribavirin v rozsahu koncentrací 20 až  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U odrůd hrušně 'Dita', 'Omega' a u jabloně 'Clijo' byl negativní fyto toxický efekt zaznamenán při použití ribavirinu ve vyšších koncentracích 80 a  $160 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

*In vitro* kultura jabloně 'Clijo' vitálně prorůstající v průběhu chemoterapie na MS médiu s ribavirinem v koncentraci  $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



*In vitro* kultura jabloně 'Clijo' - příznaky fyto toxicity na MS médiu s ribavirinem v koncentraci  $80 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

## PRINCIPY KRYOPREZERVACE V KAPALNÉM DUSÍKU

Kryoprezervace je perspektivní metoda konzervace genetických zdrojů rostlin ve velmi nízké teplotě, obvykle při teplotě bodu varu tekutého dusíku, tedy při  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rostlinné buňky jsou v průběhu kryoprezervace vystaveny působení velmi nízkých teplot, na které nejsou z přírody přizpůsobeny. Z hlediska typu výchozího rostlinného materiálu pro kryoprezervaci je možno kryoprezervovat buď dormantní pupeny, nebo lze jako výchozí rostlinný materiál použít *in vitro* kultury. Přestože jsou kryoprezervační postupy pro většinu druhů a odrůd stále ve vývoji, lze kryoprezervaci vzhledem k rychlosti mrazení rozdělit do dvou základních skupin: dvoustupňovou metodu kryoprezervace a vitrifikační metody. Dvoustupňová kryoprezervace využívá programovatelného zmrazovacího zařízení pro pomalejší řízený pokles teploty. Teplota se přitom snižuje kontrolovaně rychlostí přibližně  $0,1$  až  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  za minutu až do  $-30$  nebo  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při této teplotě se vzorky určitou dobu (obvykle 24 hodin) ponechávají a potom následuje rychlé ponoření do kapalného dusíku.

Novější techniky kryoprezervace *in vitro* kultur využívají vitrifikačního protokolu, kdy s pomocí kryoprotektivních směsí a velmi rychlého zamrazení dochází ve sledovaném materiálu k přechodu vody do pevného skupenství tvorbou amorfní sklovité hmoty a je tak omezen škodlivý efekt intracelulární tvorby ledu. Vitrifikace je metoda založená na tvorbě biologických skel při přímém ponoření vzorku do kapalného dusíku. Tato metoda se liší od dvoustupňové kryoprezervace zejména v přípravné fázi před vlastním zamražením, kdy jsou používány vysoce koncentrované roztoky kryoprotektantů, jako je například DMSO, glycerol, etylenglykol nebo sacharóza. Tyto koncentrované roztoky mohou být toxické pro buňky, a proto je důležité věnovat pozornost době působení činidla vzhledem k velikosti explantátu a řádnému vymytí kryoprotektantu po ukončení procedury odtávání před nasazením na regenerační média. Toxicita vitrifikačních činidel může být také snížena jejich aplikací nikoliv při pokojové teplotě, ale při nízké nulové nebo těsně nadnulové teplotě.

Další novou variantou je vitrifikační protokol spojený s enkapsulací (obalením) a dehydratací, kdy se vzrostné vrcholy obalí alginátem sodným, následuje předkultivace na médiu s vyšším obsahem sacharózy a poté se alginátové kapsule s rostlinným materiálem dehydratují ve sterilním prostředí, například proudem vzduchu v laminárním boxu, nebo nad silikagelem. Dehydratace a snížení obsahu vody v alginátové kapsuli je rozhodující pro vyloučení možné tvorby ledových krystalů zejména v průběhu zamrazování a odtávání biologického vzorku. Po přípravné fázi se vzorky zamrazí přímým ponořením do kapalného dusíku. Tuto metodu je možno také spojit s otužováním mateřských rostlin, jež mohou být vystaveny po dobu několika týdnů působení chladu. Alginátové kapsule chrání meristémy před nepříznivými účinky změn v průběhu kryoprezervačního protokolu, nebo může zmírňovat toxicitu při použití koncentrovanějších kryoprezervačních činidel. Všechny popisované metody lze využít při kryoprezervaci ovocných dřevin.

Jednou z variant vitrifikace je metoda nazvaná anglicky „droplet vitrification“ neboli kapková vitrifikace. Při této metodě je kapka kryoprotektivní látky obsahující zároveň zamrazovaný rostlinný





materiál nanesena na tenký hliníkový proužek a s ním pak po zaschnutí následně ponořena přímo do kapalného dusíku.

Rostliny jsou poškozovány při kryoprezervaci hlavně dvěma protichůdnými faktory. Těmito faktory jsou tvorba intracelulárních krystalů ledu v protoplazmě a dehydratace protoplazmy při vymrzání vody do extracelulárních prostor. Poškození buněčných membrán narůstajícími krystaly ledu bývá letální, protože vede ke ztrátě polopropustnosti. Vitřifikovaný stav a hodnocení fázových přechodů v průběhu kryoprezervace je možno měřit použitím diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), což je nejcitlivější metoda pro určení fázových přechodů a skelného stavu.

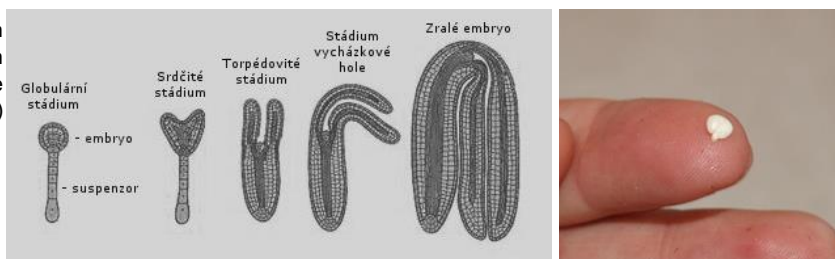
Při použití *in vitro* kultur jako výchozího rostlinného materiálu pro kryoprezervaci by ideální proliferací médium mělo optimalizovat nejen počet vytvořených výhonů, ale také jejich kvalitu. Pro *in vitro* kulturu, která je před vlastní kryoprezervací vystavena otužování, je dobré olistění a zdravě prorůstající výhony základem pro přežití při dlouhodobém vystavení nízké teplotě.

Po fázi kryoprezervace následuje odtátí vzorku a regenerace. U kryoprezervačních metod založených na rychlém zmrazení a vitřifikaci se tání provádí většinou rychle z důvodu snížení rizika rekrystalizace ledových krystalků a poškození buněk. Velmi rychlé tání lze provést například přímým ponořením rozmrazovaného materiálu do vodní lázně o teplotě 40 °C. Rostliny regenerované po kryoprezervaci je nutné po převodu do běžných kultivačních podmínek sledovat, protože různé faktory spojené se specifickými podmínkami *in vitro* kultury a fází kryoprotekce mohou ovlivnit genetickou stabilitu uchovávaného rostlinného materiálu.

## VYUŽITÍ FYTOHORMONŮ PRO KLÍČENÍ NEVYZRÁLÝCH EMBRYÍ U RANÝCH ODRŮD

Velkým problémem u raných odrůd peckovin je fakt, že dozrávání plodů předchází dozrávání embryí, které tak nemají dostatečný čas dosáhnout plné velikosti a fyziologické zralosti, což má za následek jejich odumírání. Získání hybridního materiálu výsevem stratifikovaných semen je proto u raně zrajících odrůd často téměř nemožné. Z nevyzrálých embryí lze dopěstovat semenáčky metodou *in vitro* kultivace.

Stádia vývoje embrya u dvouděložných rostlin (upraveno dle Smith et al., 1946)



Embryo vypreparované ze semena třešně

Založení embryokultury závisí na izolaci embrya bez poškození, formulování vhodné živné půdy a navození kontinuálního embryogenního růstu až po tvorbu semenáčků. Úspěšnost kultury založené z nezralých embryí je silně závislá na vývojovém stádiu, ve kterém se embryo nachází při izolaci. Obecně lze říct, čím vyšší vývojové stádium embrya, tím jednodušší je pěstování *in vitro*. Dopěstování embryí v raní globulární fázi je spojeno s potížemi, což souvisí s příjmem živin přes suspensor. Suspensor se však exstirpací často poruší a nemůže tak zastávat ani svou vodivou ani syntetickou funkci. V pozdní globulární a rané srdčité fázi přechází embryo z převážně suspensorové výživy na výživu povrchovou, kdy hlavním zdrojem výživných a regulačních látek je endosperm. Jeho výživná funkce může být nahrazena kultivačním médiem. Embryo při svém vývoji přechází od heterotrofní fáze k autotrofní. Embrya v heterotrofní fázi vývoje obvykle vyžadují pro svůj řádný vývoj přítomnost růstových regulátorů. Po přechodu na autotrofní způsob výživy v pozdní srdčité fázi již embryo není závislé na vnějším zdroji růstových regulátorů a je mnohem přístupnější pro *in vitro* kultury.

Kultivační médium má poskytovat embryu ve vhodné formě zdroj uhlíku, dusíku, makro a mikroelementy a stimulační látky. Pro embryo kultury je používáno různých pevných médií. Asi nejvyužívanější médium je MS (Murashige and Skoog) i v různých modifikacích, např. MMS médium (Ramming), dále B5 médium (Gamborg), WP médium (woody plant), Knopp médium, C<sub>2</sub>d médium (Chee médium). Přesné požadavky na výživu závisí na stupni vývoje embrya. V heterotrofní fázi mladší embryo vyžaduje komplexnější médium a vyšší osmotický tlak než embryo starší. Pokračující

vývoj mladých embryí vyžaduje komplexní médium doplněné kombinacemi vitamínů, aminokyselin a růstových hormonů. V autotrofní fázi můžou embrya růst již na jednoduchém médiu obsahujícím anorganické soli a doplněném o zdroj uhlíku. Hlavním zdrojem uhlíku, a tedy i energie, embryí kultivovaných *in vitro* jsou glycidy, především sacharóza. Jako zdroj dusíku se používají amonné soli nebo nitráty pro vývojově starší embrya a organické kyseliny (malát, citrát) nebo aminokyseliny (glutamin, asparagin) pro vývojově mladší stádia. Vitamíny se používají jako složka médií především při kultivaci velmi mladých embryí. Jejich přítomnost však není vždy nezbytná. Nejčastěji se používají thiamin, pyridoxin, kyselina nikotinová, pantotenová, askorbová a biotin.

Auxiny a cytokininy stimulují růst embryí při nízkých koncentracích, vysoká koncentrace auxinů růst naopak inhibuje. U nezralých embryí se často stává, že dojde k vynechání posledních fází embryogeneze. Nevyzrálá embrya mají totiž tendenci předčasně klíčit bez úplného dokončení embryonálního vývoje co má za následek vznik slabých semenáčků, případně i zvýšený výskyt abnormalit. Tomu se dá předejít vyšší koncentrací sacharózy a tedy zvýšením osmotického tlaku nebo přidáním kyseliny abscisové, ABA. Naopak kyselina giberelová klíčení stimuluje nebo se používá na překonání dormance. Při klíčení embryí bylo zjištěno, že kyselina giberelová v různé škále koncentrací podporuje prodlužování hypokotylu a kořenů, zatímco cytokininy obvykle růst kořenů potlačují a podporují rozvoj listů. Auxiny při nízkých koncentracích podporují růst radikuly. Použité koncentrace fytohormonů se pohybují v rozmezích: auxiny IAA (indol-3-octová kyselina) 0,1 až 1 mg · l<sup>-1</sup>, IBA (indolyl-3-másečná kyselina) 0,1 až 1 mg · l<sup>-1</sup>, NAA (naftyloctová kyselina) 0,1 až 0,5 mg · l<sup>-1</sup>; cytokininy BA (benzyladenin) 0,2 až 5 mg · l<sup>-1</sup>, kinetin 0,01 až 2 mg · l<sup>-1</sup>; gibereliny GA<sub>3</sub> (kyselina giberelová) 0,1 až 10 mg · l<sup>-1</sup>.

Světlo a teplota jsou dva hlavní environmentální faktory rozhodující pro úspěšnou kultivaci embryokultur. Embrya obvykle rostou nejlépe, když jsou první 1–2 týdny od založení kultury udržovány ve tmě a potom přemístěny do světla, což umožní tvorbu chlorofylu. Světlo embrya vyžadují především v poslední fázi embryogeneze a při klíčení. Izolovaná embrya často klíčí v širším rozsahu teplot než neporušená semena. Některá embrya zase vyžadují působení nízkých teplot (kolem 4°C) na prolomení dormance. Například pro růst třešňových embryí bylo vhodné použít chladovou stratifikaci až po dobu 40–60 dnů a to jak pro nezralá tak pro zralá embrya. Snížená teplota brání i předčasnému klíčení. Optimální teplota pro růst a klíčení embryí se pohybuje v rozmezí 20–30°C.



Vzrostlé semenáčky hybridů třešně v půdě

## Kontrolní otázky

1. Co jsou to regulátory rostlinného růstu a které nejčastěji se využívá pro *in vitro* kultivaci rostlin?
2. Které zdroje energie jsou využívána pro *in vitro* kultivaci rostlin?
3. Co je to agar a k čemu se využívá?
4. Co je to kultivační médium a jaká jsou jeho hlavní složky?
5. Jaké jsou výhody *in vitro* kultivace rostlin a příklady rostlin, které jsou pro tuto kultivaci využívány?
6. Uveďte, jaké teplotní rozmezí se používá při ozdravování rostlin termoterapií?
7. Jaká chemická látka se nejčastěji používá při chemoterapii?
8. Vyjmenujte rozdíly mezi dvoustupňovou kryoprezervací a rychlým zamražením vitifikací

## Praktické cvičení - pokus kategorie a - vyžadující běžné vybavení

1. Od listopadu do března odeberte každý měsíc dormantní výhony nejméně 3 druhů ovocných dřevin, tak abyste měli pokaždé k dispozici nejméně 100 pupenů od každé ovocné dřeviny. Na spodní části výhonu proveďte štěpařským nožem šikmý řez v délce dvou třetin průměru výhonu a takto upravené výhony dejte narašit do vody.



3. Každý měsíc stanovte procento rašících pupenů u každého ovocného druhu.
3. Na základě nejlepšího výsledku rašení stanovte nejvhodnější dobu odebírání dormantních výhonů od jednotlivých ovocných druhů pro preparaci výchozích explantátů a úspěšné založení *in vitro* kultury.



### Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Vliv fytohormonů na klíčení embrya *in vitro*.

1. Z plodů raně zrajících třešní (příp. meruněk, podle možnosti) sklizených ze sadu ještě v době před sklizňovou zralostí vylouštíme pecky.
2. Pecky povrchově dezinfikujeme v 10% roztoku Sava s přidáním 0,3% roztoku fungicidu Rovral po dobu 1,5–2 hodin.
3. Z pecek následně exstirpujeme embrya, která ošetříme namočením do 0,15% roztoku chloridu rtuťnatého s přidáním několika kapek smácedla Tween 20 po dobu 2 minut a poté opláchneme sterilní destilovanou vodou.
4. Embrya rozdělíme na příslušné varianty média podle nejméně 3 různých koncentrací fytohormonů v Petriho miskách (příp. Erlenmeyerových baňkách), kultivujeme v kultivační místnosti a po dobu několika týdnů sledujeme a zaznamenáváme změny.
5. Vyhodnotíme, která kombinace hormonů je nejvhodnější pro iniciaci klíčení embrya.

### Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Preparace růstového vrcholu jako výchozího explantátu pro založení *in vitro* kultury.

1. Do vody dejte narašit dormantní výhony ovocné dřeviny odebrané ze sadu v období vegetačního klidu. Na spodní části výhonu proveďte štěpařským nožem šikmý řez v délce dvou třetin průměru výhonu.
2. Po narašení vyřízněte rašící pupen i s částí dřeva. Z rašícího vegetačního pupene odstraňte skalpelem a pinzetou povrchové struktury bránící sterilizaci (šupiny, základy listů).
3. Z takto připraveného explantátu vypreparujte vrcholy o velikosti 5 –10 mm obsahující meristemickou vrcholovou oblast a základy listů. Pro preparaci lze využít i stereoskopický mikroskop. Zakreslete výsledný vypreparovaný explantát.



### Praktické cvičení - pokus kategorie c - možno realizovat po dohodě pouze na specializovaných pracovištích

1. Po dohodě se specializovaným pracovištěm zjistěte po 1 měsíci multiplikační koeficient nejméně 3 vybraných odrůd ovocných dřevin na nejméně dvou typech pěstebních médií



- s různou koncentrací cytokininů a vypracujte tabulku multiplikace po vzoru tabulky 1 (uvedena v tomto výukovém modulu).
2. Porovnejte koeficienty množení a určete nejlepší a nejhorší výsledek multiplikace u jednotlivých odrůd na pěstebních médiích s různou koncentrací fytohormonů.
  3. Pro každou odrůdu použitou v pokuse doporučte nejvhodnější pěstební médium pro vyvolání množení.

## Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Izolace meristémů česneku kuchyňského

### 1) Příprava média

Médium pro založení kultur (Co)

V destilované vodě na míchadle s ohřevem je rozpuštěn agar a postupně jsou přidány makroelementy, mikroelementy, železo, vitamíny a sacharóza. Na 1000 ml destilované vody (pro uvaření litru média) je potřeba 6000 mg agaru.

Po jeho rozpuštění jsou přidány ostatní suplementy a to tak, že 30 000 mg sacharózy je rozpuštěno v destilované vodě a k tomuto roztoku jsou přidány ostatní suplementy (tab. 1). Médium je připraveno ve chvíli, kdy se na dně nádoby začínají tvořit bublinky, a barva média se stává průhledným. Konečné pH 6 je upraveno buď 5% NaOH nebo 1M roztok HCl.

Tab. 1 Komponenty MS média

component	mg.l-1
agar	6000
saccharose	30000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	440
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA·2 H <sub>2</sub> O	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	27,8
nicotinic acid	0,5
pyridoxine	0,5
thiamine	0,1
myo-inozitol	100

Uvařené médium je rozléváno do velkých zkumavek automatickým dávkovačem média v množství přibližně 10 ml na zkumavku. Zkumavky jsou poté uzavřeny alobalovým víčkem a





připraveny na sterilizaci v autoklávu po dobu 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu je médium zchlazeno při pokojové teplotě uskladněno v temnu.

### Médium pro vypreparované meristémy (C1)

Médium určené pro vypreparované meristémy je vařeno stejným způsobem jako Co médium, ale do směsi jsou přidány růstové regulátory (uvedeno v mg.l<sup>-1</sup>).

BA - 0,5

NAA - 0,1

GA3 - 0,5

### 2) Založení in vitro kultur

Česnek kuchyňský je rozdělen na jednotlivé stroužky a zbaven obalových šupin. Stroužky jsou vloženy do teplé (ne horké!!) vody se saponátem nebo Tweenem. Následuje práce ve flowboxu. Před zahájením práce je nutné celý flowbox vytřít lihem. Stroužky jsou povrchově desinfikovány 0,2 % HgCl<sub>2</sub> po dobu 10-15 minut (všechny stroužky musí být ponořeny). Po desinfekci je chlorid přelit do speciální nádoby s použitým HgCl<sub>2</sub> a stroužky jsou čištěny sterilní destilovanou vodou (3x10 minut).

Po povrchové desinfekci jsou jednotlivé stroužky vkládány do zkumavek s médiem Co. Takto založené vzorky jsou poté kultivovány při teplotě 22-26 °C a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. V průběhu kultivace jsou postupně vyřazovány stroužky napadené houbovými nebo bakteriálními infekcemi. Na tomto médiu jsou stroužky kultivovány minimálně do doby přírůstku listů 5 cm, maximálně jeden měsíc. V této fázi jsou stroužky připraveny na preparaci meristému.

### 3) Preparace (izolace) meristému

Vlastní preparace meristémů probíhá opět ve sterilním prostředí flowboxu. Meristémy o velikosti přibližně 1 mm jsou izolovány pod binokulární lupou skalpelem a pinzetou. Před zahájením izolace je lupa desinfikována lihem a ponechána minimálně 20 minut ve flowboxu (k povrchové desinfekci sterilním vzduchem). Na každý meristém jsou použity sterilní nástroje.

Postup izolace je takový, že jsou odstraněny horní 2/3 stroužku, kořeny a poté jsou odstraněny vnější části kolem dokola. Zbytek stroužku je zpracováván pod binokulární lupou tak, že jsou postupně odlupovány jednotlivé zdužnatělé listy, až k samotnému meristému. Práci je třeba vykonávat opatrně, protože může snadno dojít k poškození meristému rozmáčknutím nebo přeríznutím. Izolovaný meristém je pomocí skalpelu přenesen na C1 médium a následuje kultivace při teplotě 22-26 °C a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma.

Po 4 týdnech jsou meristémy přeneseny na čerstvé C1 médium. Meristémy, později mladé rostlinky, jsou přenášeny („pasážovány“) přibližně každé 4 týdny na nové médium.