

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**Vliv různých druhů cytokininů na
zakořeňování moruše černé
*in vitro***

Michaela Medková

Tišnov 2013

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství (č. 7)

**Vliv různých druhů cytokininů na
zakořeňování moruše černé *in vitro***

**The effect of various kinds of cytokinins
on *Morus nigra* rooting *in vitro***

Autor: Michaela Medková

Škola: Gymnázium Tišnov, Na Hrádku 20, Tišnov, 666 01

Konzultant: Ing. Helena Vlašínová, Ph.D.

Tišnov 2013

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V dne podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. a Martině Jůzové za seznámení s problematikou cytokininů, pracovními postupy v laboratoři a za jejich pomoc a podnětné rady při psaní práce. Děkuji také Mendelově univerzitě, za jejíž finanční podpory byla tato práce vypracována a pracovníkům oddělení chemické biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci za souhlas s využitím cytokininů, které syntetizovali, v mé práci.

Anotace

Hlavním cílem práce bylo otestovat využití čtyř vybraných cytokininů na kultivaci kultur *in vitro* moruše černé a popsat účinky těchto cytokininů v pěti pozorovaných parametrech. Dále se práce zaměřovala na hledání takového cytokininu, který v *in vitro* kulturách moruše černé stimuluje proliferaci prýtků, aniž by inhiboval zakořeňování, a snižoval množství chlorofylu v listech explantátů. Pozornost byla soustředěna na cytokinin se zkratkou CEP, což je derivát meta-topolinu, nedávno vyvinutý pracovníky Univerzity Palackého v Olomouci, jehož účinky zatím nejsou plně prozkoumány. Agronomická fakulta Mendelovy univerzity odkoupila tento cytokinin a cytokinin se zkratkou THPP za účelem zkoumání a porovnávání jejich účinků na procesy v rostlinách s ostatními cytokininy.

Zjištěné výsledky byly popsány, zpracovány do grafů a tabulek a porovnány s výsledky předešlých prací, provedených na téma mikropropagace rostlin. Bylo vyhodnoceno, které cytokininy jsou při přidání do kultivačního média optimální k dosažení co nejlepších kultivačních výsledků a které naopak navozují nežádoucí inhibiční účinky.

Klíčová slova: kultivace *in vitro*; fytohormony; cytokininy; moruše černá; zakořeňování; mikropropagace

Annotation

This study is aimed to examine the use of four chosen cytokinins on *in vitro* culture of *Morus nigra* and describe their influence by the means of five observation parameters. The study is also focused on seeking such cytokinin, which will stimulate shoots proliferation in *in vitro* culture of *Morus nigra* and simultaneously won't inhibit explant rooting and the amount of chlorophyll in its leaves. The attention was payed to the cytokinin abbreviated as CEP, which is a meta-topoline derivative, recently developed by the Palackeho University employees in Olomouc. Its influence on explants hasn't been examined much yet. The Mendel University's Agronomic faculty bought the cytokinins known as CEP and THPP in order to examine and compare their influences on the processes in plants with other cytokinins.

The results were described, compiled into graphs and tables and compared with the results from previous studies made on the topic of micropropagation of plants. It was evaluated, which cytokinins are optimal to be added to the cultivation medium and which would induce undesirable inhibit influences.

Key words: *in vitro* cultivation, phytohormones, cytokinins, *Morus nigra*, rooting, micropropagation

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam zkratk | 9 |
| 1. Úvod | 10 |
| 2. Literární přehled | 11 |
| 2.1. Vegetativní rozmnožování rostlin | 11 |
| 2.1.1. Makropropagace | 11 |
| 2.1.2. Mikropropagace | 11 |
| 2.1.3. Kultivace rostlin <i>in vitro</i> | 11 |
| 2.2. Stadia mikropropagace <i>in vitro</i> | 12 |
| 2.2.1. Stadium 0 – selekce a příprava mateřské rostliny | 12 |
| 2.2.2. Stadium I – zakládání aseptické kultury | 12 |
| 2.2.3. Stadium II – fáze proliferace explantátové kultury | 12 |
| 2.2.4. Stimulace axilárního větvení | 13 |
| 2.2.5. Stadium III – zakořeňování <i>in vitro</i> | 13 |
| 2.2.6. Stadium IV – zakořeňování <i>in vivo</i> a aklimatizace | 13 |
| 2.3. Kultivační podmínky | 14 |
| 2.3.1. Světelné podmínky kultivace | 15 |
| 2.4. Kultivační média | 15 |
| 2.5. Složení médií | 15 |
| 2.5.1. Makroelementy | 16 |
| 2.5.2. Mikroelementy | 16 |
| 2.5.3. Zdroj uhlíku a energie | 16 |
| 2.5.4. Vitamíny | 16 |
| 2.5.5. Fytormony | 16 |
| 2.5.5.1. Cytokininy | 17 |
| 2.5.5.2. Struktura a charakteristika použitých cytokininů | 17 |
| 2.5.5.3. Historie cytokininů | 18 |
| 2.5.5.4. Vlastnosti cytokininů | 19 |
| 2.5.5.5. Účinky cytokininů | 19 |
| 2.5.6. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku | 19 |
| 2.5.7. Nedefinované organické složky médií | 20 |
| 2.5.8. Látky používané pro zpevnění média | 20 |
| 2.6. Kultivační nádoba | 21 |
| 2.7. Moruše černá | 22 |
| 2.7.1. Morfologie moruše | 22 |
| 2.7.2. Výskyt moruše | 22 |
| 2.7.3. Ostatní odrůdy moruše | 23 |
| 2.7.4. Užití moruše | 23 |
| 2.8. Laminární box | 23 |
| 2.9. Autokláv | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Materiál a metodika | 24 |
| 3.1. Moruše černá (Morus nigra) | 24 |
| 3.2. Kultivace moruší | 24 |
| 3.3. Použité regulátory růstu | 24 |
| 3.4. Kultivační médium | 24 |
| 3.5. Autoklávování | 25 |
| 3.6. Sterilita prostředí při práci | 25 |
| 3.7. Kultivační nástroje a pomůcky | 26 |
| 3.8. Zařízení laboratoře explantátových kultur | 26 |
| 3.9. Laminární box | 26 |
| 3.10. Kultivační místnost | 26 |
| 3.11. Postup práce | 27 |
| | |
| 4. Výsledky | 29 |
| 4.1. Výsledky měření | 29 |
| 4.1.1. Výsledky měření délky a počtu kořínků | 29 |
| 4.1.2. Fotodokumentace kořenového systému explantátů | 32 |
| 4.1.3. Výsledky měření průměrné výšky a počtu nově diferenciovaných prýtků | 33 |
| 4.1.4. Výsledky měření velikosti kalusu | 37 |
| 4.1.5. Výsledky měření barvy listů | 38 |
| 4.1.6. Výsledky měření délky kořínků po přepasážování na médium prosté cytokininů | 39 |
| 4.1.7. Fotodokumentace pozorování provedeného po 21 dnech kultivace | 41 |
| 4.1.8. Fotodokumentace pozorování provedeného po 42 dnech kultivace | 42 |
| 4.1.9. Fotodokumentace pozorování provedeného po 63 dnech kultivace | 43 |
| 4.1.10. Fotodokumentace pozorování provedeného po 77 dnech kultivace | 44 |
| 4.1.11. Fotodokumentace kontaminovaných explantátů | 45 |
| | |
| 5. Diskuse | 46 |
| 5.1. Délka a počet kořínků | 46 |
| 5.2. Výška a počet prýtků | 46 |
| 5.3. Velikost kalusu | 47 |
| 5.4. Barva listů (hladina fotosyntetických barviv) | 47 |
| 5.5. Délka a počet kořínků po přepasážování | 47 |
| | |
| 6. Závěr | 48 |
| | |
| 7. Seznam použité literatury | 49 |

Seznam zkratek

| | |
|-------------|--|
| 0 | kontrolní kultivační médium prosté cytokininů |
| CEP | 6-(3-methoxybenzylamino)purine-9-β-D-(6(3MeOBA)9CEP) |
| BAP | benzylaminopurin |
| MT | meta-topolin (3-hydroxybenzylaminopurin) |
| THPP | 6-benzylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl-purin |

1. Úvod

Cytokininy jsou jednou z hlavních pěti skupin rostlinných hormonů (fytohormonů), které regulují růstové a vývojové procesy v rostlinách. Přírodní cytokininy jsou po chemické stránce deriváty adeninu. Působí na fyziologické procesy v interakci či kooperaci s ostatními fytohormony, zejména s auxinem (jiný fytohormon). Z fyziologických účinků cytokininů je důležitá především jejich schopnost v interakci s auxinem iniciovat diferenciaci pupenů a kořenů v kulturách kultivovaných explantátů.

Fytohormony by mohly v budoucnosti najít bohaté uplatnění v zemědělství. Jejich komerční využití zatím spočívá hlavně v sadovnictví a v rostlinných biotechnologiích. Cytokininy jsou významnou složkou kultivačních médií při mikropropagaci a regeneraci rostlin *in vitro*, dále se používají při stimulaci větvení okrasných rostlin, za účelem větší tvorby květů, ale i semen anebo řízků. Vlivem cytokininů dochází k navýšení počtu zrn v klasech obilovin, prodlužuje se skladovatelnost řezaných květů, zvyšuje se produkce biomasy, dále jsou rostliny odolnější vůči stresovým podmínkám, atd. V současnosti probíhají také výzkumy s cytokininovými deriváty se zaměřením na jejich protinádorovou aktivitu, jelikož bylo zjištěno, že některé speciální deriváty mají schopnost indukovat apoptózu nebo blokovat buněčný cyklus při různých rakovinných onemocněních [1].

Rostlinný materiál byl kultivován *in vitro* metodou mikropropagace. K mikropropagaci se nejčastěji využívají růstové regulátory na bázi cytokininů, a to zejména kvůli svým stimulačním účinkům na proliferaci prýtků a zvyšování hladiny fotosyntetických barviv. Dříve se do kultivačních médií nejvíce přidával benzylaminopurin, od kterého se však v současnosti upouští a hledají se jeho nové analogy. I když benzylaminopurin výrazně stimuluje proliferaci prýtků, při pozorování vývoje kořínků byly zaznamenány nežádoucí inhibiční účinky, a proto se pracuje na vývoji dalších alternativ benzylaminopurinu, které mají méně negativní vedlejší účinky na vývoj a růst kořenového systému.

Moruše černá je rostlina ceněná pro svůj vysoký obsah antioxidantů a její plody poskytují bohatý potravinový zdroj. Moruši má smysl mikropropagovat, protože je to méně pěstovaná rostlina, méně náročná na podmínky pěstování.

2. Literární přehled

2.1. Vegetativní rozmnožování rostlin

Rozmnožování rostlin můžeme dělit na pohlavní a nepohlavní. Při rozmnožování pohlavním se vyvíjí nový jedinec z embrya, naopak při rozmnožování nepohlavním nevzniká nový jedinec splynutím samčích a samičích gamet, ale množením mateřské rostliny. V takovém případě můžeme mluvit o klonování, tedy tvorbě genetických klonů. Genetické klony se odvozují od jednoho jedince a jsou jeho pravou genetickou kopií.

Z hlediska nepohlavního rozmnožování rozlišujeme metodu makropropagace a metodu mikropropagace [2].

2.1.1. Makropropagace

Metody makropropagace se využívají pro zemědělské a sadařské účely, kdy je výhodné pěstovat populace rostlin, které jsou geneticky identické. Takovéto vegetativní rozmnožování má zásadní význam zejména v zemědělství a zahradnictví. Protože je k tomuto rozmnožování třeba ve srovnání relativně velká část rostlinného organismu, nazývá se makropropagace a metody bývají označovány jako makrometody [2].

2.1.2. Mikropropagace

Při vegetativním rozmnožování metodou mikropropagace se kultury zakládají z malých kousků pletiv (explantátů), z tohoto důvodu tuto metodu nazýváme mikropropagací [2]. Mikropropagace probíhá v podmínkách *in vitro*, tedy v podmínkách umělých.

2.1.3. Kultivace rostlin *in vitro*

Při kultivaci rostlin *in vitro* se zakládají explantátové kultury rostlin a probíhá aseptická kultivace izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Pro založení explantátové kultury je třeba izolovat buňky, pletiva nebo orgány a kultivovat je ve sterilních podmínkách řízeného prostředí, zahrnujících mimo jiné definovaná kultivační média, teplotu, vlhkost a kvalitu a kvantitu světla [3]. Všechny tyto faktory významně ovlivňují průběh kultivace.

Explantátové kultury je možné kultivovat jen po určitou dobu a je nutné je pravidelně přenášet na čerstvé živné médium. Výhodou kultivace je, že za určitých podmínek může být v podstatě jakákoli část donorové rostliny dopěstována v novou rostlinu. Často se ke kultivaci používají vegetativní vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů nebo kořene, embrya, semena, spory i jednotlivé buňky.

Kultivace probíhá v základním cyklu: rostlina – explantát – kultura *in vitro* – organogeneze – intaktní rostlina, tedy nová, celistvá rostlina.

Jednou z možností je kultivace za specifických podmínek v uzavřených nádobách umožňující pěstovat jak celistvé explantáty, tak jejich oddělené části. Hlavními výhodami množení explantátů *in vitro* jsou malý rozměr explantátu, vysoký množitelský koeficient, zkrácení množitelského cyklu a také možnost kontinuálního množení i v období vegetačního klidu [3], [4].

2.2. Stadia mikropropagace *in vitro*

Profesor Murashige (1974) definoval tři stadia (I, II, III) *in vitro* multiplikace. Tato klasifikace popisuje jednotlivé kroky při postupu a definuje jednotlivé podmínky kultivace v jednotlivých stadiích [4]. O několik let později byla k těmto stadiím přiřčena ještě další dvě (0, IV), takže v současnosti rozlišujeme pět stadií mikropropagace [3].

2.2.1. Stadium 0 – selekce a příprava mateřské rostliny

V tomto stadiu musíme jasně definovat původ mateřské rostliny a zajistit její sterilizaci. Za normálních podmínek se provádí pouze jednoduchá povrchová sterilizace omýváním pod tekoucí vodou, která zajistí redukci přítomných mikroorganismů na povrchu rostliny. Při některých metodách mikropropagace je ale potřeba provést tzv. předošetření donorové rostliny, prováděné např. ponořením do desinfekčního roztoku [3].

Při práci nebylo metod sterilizace užito, protože byl explantát izolován z již kultivovaných moruší. Nehrozilo tedy nebezpečí kontaminace mikroorganismy z povrchu rostliny.

Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován ročním obdobím, kdy je explantát odebrán, změnou teploty, délkou dne, hladinou osvětlení, dostupností vody, ... Tyto faktory mění obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlině a tím významně ovlivňují její růst [5].

2.2.2. Stadium I – zakládání aseptické kultury

Pro toto stadium už je nutné, aby byl explantát bez jakékoli kontaminace. Dalším krokem je izolace určité části rostlinného organismu a její uložení na médium. Poté je třeba sledovat, zda kultura nekontaminovala. Kontaminace nastává během 3 až 5 dní v případě, že sterilizace u donorové rostliny nebyla úspěšná nebo byl explantát při přenosu na kultivační médium vystaven nesterilním podmínkám. Pokud kultura zkontaminuje, je možné zdravé explantáty zachránit subkultivací [3] neboli přepasážením, tedy přenosem explantátu na nové kultivační médium.

2.2.3. Stadium II – fáze proliferace explantátové kultury

V tomto stadiu je hlavním úkolem namnožení explantátu. Za opakovaného pasážením na čerstvé médium se zvyšuje počet explantátů v kultuře rostlinného materiálu. Proces je ukončen tehdy, kdy bylo dosaženo žádaného počtu prýtků, buněk, embryí nebo kořínků. Diferenciace buněk může probíhat formou:

- stimulace tvorby prýtků
- tvorby adventivních prýtků
- somatické embryogeneze [3].

2.2.4. Stimulace axilárního větvení

Při práci na kultivaci moruší bylo využíváno klonové větvení stimulací postranního větvení. Při této metodě bývají jako explantáty využívány vzrostné vrcholy stonků, ze kterých můžou v závislosti na kultivačních podmínkách vznikat nové prýty, které budou opět obsahovat vrcholový pupen. Tvorbu prýtů můžeme stimulovat přidáním relativně vyšší koncentrace cytokininů do kultivačního média. Přidáním cytokininů do kultivačního média zajistíme inhibici apikální dominance. To znamená, že narušíme vztah mezi vrcholovým pupenem a postranními pupeny, které jsou při apikální dominanci vrcholovým pupenem inhibovány. Inhibice apikální dominance je základním předpokladem pro větvení, kde se snažíme dosáhnout co největšího koeficientu množení postranních pupenů, z nichž lze zakládat nové explantátové kultury. Pokud jsme dosáhli namnožení požadovaného množství prýtů, mohou být prýty přepasážovány na médium, které stimuluje jejich zakořeňování [3], [5].

2.2.5. Stadium III – zakořeňování *in vitro*

V průběhu tohoto stadia prýty zakořeňují. Toto stadium představuje jednu z nejobtížnějších fází celé mikropropagace. Na začátku fáze zakořeňování je potřeba explantáty přepasážovat na kultivační médium, které neobsahuje cytokininy, jelikož by cytokininy mohly růst kořenů inhibovat, v závislosti na větší míře tvorby kalusu, ze kterého se kořínky odlamují. Další faktory ovlivňující úspěšné zakořeňování explantátu jsou světlo, teplota, makroelementy, mikroelementy a organické komponenty obsažené v médiu. Tvorbu kořenů můžeme stimulovat přepasážováním na médium obsahující auxiny. U některých druhů je nutné auxiny aplikovat po celý průběh zakořeňování, na některé druhy však po indukci tvorby kořenů může další přítomnost auxinu při zakořeňování působit negativně a inhibovat růst kořenů. Zakořeňování je také závislé na druhu použitého média [3].

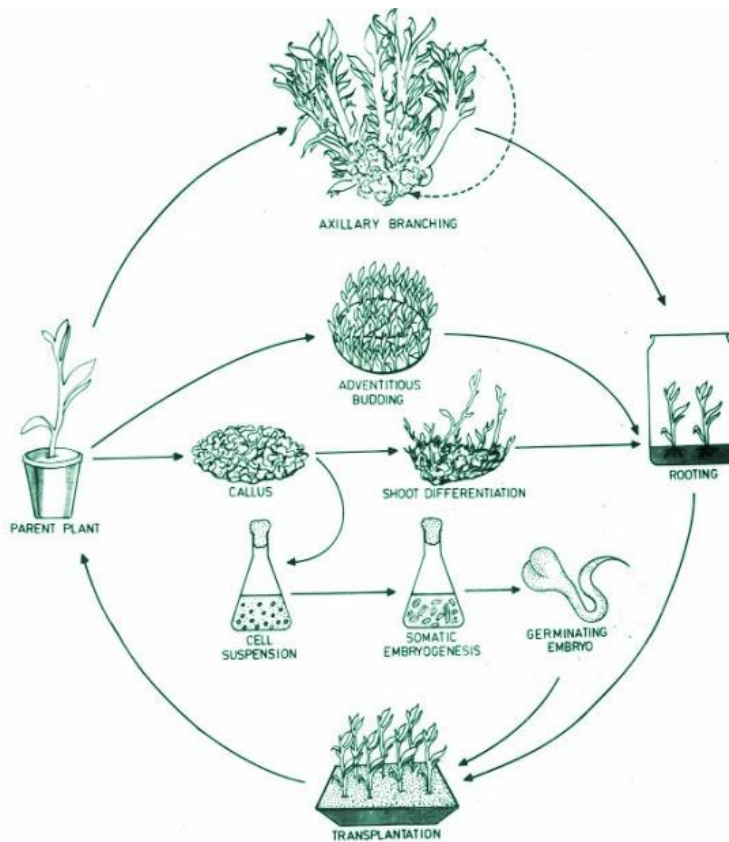
Pokud je explantát kultivován na pevném médiu, obsažený agar může způsobit špatnou aeraci média a tím navozovat redukci kořenových vlásků. V současné době je upřednostňováno zakořeňování v přirozeném prostředí, tedy v půdě. Zakořeňování *in vivo*, jak se také tato metoda nazývá, je totiž účinnější než sterilní zakořeňování *in vitro*, jelikož takto odvozené kořeny velmi často postrádají kořenové vlásky, stávají se příliš křehkými pro přenos do půdy a lámou se. V takovém případě se rostlina stává neschopnou plného vyživování nebo je vyživování pro rostlinu značně obtížné [3].

2.2.6. Stadium IV – zakořeňování *in vivo* a aklimatizace

Toto stadium jako jediné probíhá v nesterilních podmínkách. Explantáty se odebírají z kultivačních médií a nechávají se zakořeňovat v umělých substrátech. Tyto substráty by měly být slabě kyselé až neutrální, mít vysokou vodní kapacitu a měly by zajišťovat dostatečnou aeraci kořenů. Před přesazením do substrátu je však velmi důležité, aby byly z kořenů důkladně opláchnuty zbytky živného média, které často ulpívají na kořenech, jinak explantátu hrozí nebezpečí kontaminace. Pokud rostlina dokonale zakořeňování, nastává fáze její aklimatizace na změněné podmínky zevního prostředí. Pro vývoj rostliny je nutná především aklimatizace na sníženou vzdušnou vlhkost a na přechod na autotrofní způsob výživy. Pro organismus to znamená,

že už dále nemůže čerpat uhlík ze sacharózy obsažené v živném kultivačním médiu, ale musí uhlík získávat z oxidu uhličitého při fotosyntéze [3].

Pro rostliny kultivované *in vitro* je nutná aklimatizace na nižší vlhkost vzduchu proto, že často nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají nefunkční průduchy pro výměnu plynů. To je způsobeno především vysokou vlhkostí v kultivačních nádobách a malou intenzitou světla v kultivačních místnostech. Jelikož mají kultivované explantáty odlišnou vnitřní strukturu listů (největším rozdílem je výrazně ztenčená vrstva palisádového parenchymu, který obsahuje chlorofyl), ve většině případů nejsou kultivované rostliny schopny intenzivní fotosyntézy. Proto se chovají heterotrofně a organické látky na výživu, především uhlík, získávají z kultivačního média. Po přenesení na substrát už však organické látky rostlinám dodávány nejsou a musí se proto postupně aklimatizovat přechodem z heterotrofie na autotrofii. To však trvá delší dobu kvůli fotosyntetické nefunkčnosti původních listů. Rostlina původní listy využívá spíše jako zásobní orgány poskytující organické látky pro růst nových listů, které už budou schopny samostatně fotosyntetizovat a regulovat osmózu buněk [3], [5].



Obr. 1: Stadia mikropropagace při kultivaci rostlin [6]

2.3. Kultivační podmínky

Mezi nejdůležitější podmínky umožňující růst a vývoj explantátových kultur patří kultivační médium. Kultivační médium představuje zdroj energie, výživy a regulačních látek. K dalším podmínkám patří světelný režim (intenzita a kvalita světla), fotoperioda a teplota. Jednou z méně

zmiňovaných, avšak také velmi důležitých podmínek je plynná fáze uzavřeného kultivačního prostředí. V tomto smyslu má význam zvýšený či snížený obsah některých plynů nebo množství vodní páry v kultivačních nádobách.

Parametry ovlivňující růst a vývoj explantátu dělíme na endogenní a exogenní. Endogenní faktory, které můžeme do určité míry ovlivnit, zahrnují kvalitu donorové rostliny (její fyziologický a genetický stav) a udržení sterility kultivace (je nutná dezinfekce explantátů a speciální manipulace). K exogenním faktorům, které jsme schopni zcela kontrolovat, patří složení živného média a fyzikální faktory kultivace zahrnující teplotu a osvětlení.

In vitro kultura je polouzavřený systém, který asepticky poskytuje kyslík, vodu, organické zdroje uhlíku, živiny a regulátory rostlinného růstu při regulované teplotě kultivačních místností. Část přírodních podmínek explantátu nahrazuje kultivační médium. Postupný pokles obsahu živin v médiu může omezovat růst explantátů, je proto třeba explantáty pravidelně pasážovat na čerstvé médium a zajistit tak dostatečný přísun živin [3], [5].

2.3.1. Světelné podmínky kultivace

Vlastnosti světla, které nejvíce ovlivňují růst a vývoj explantátů jsou: fotoperioda a intenzita osvětlení. Fotoperioda, tedy časový průběh fází světla a tmy a jejich střídání, má vliv na morfogenezi explantátů. Většina rostlin potřebuje pro stimulaci růstové fáze vývoje 12–16 hodin světla denně, tato perioda se však liší v závislosti na rostlinném druhu.

Světelná intenzita neboli množství fotonů obsažených ve světelném záření, které dopadne na explantát za určitý čas, se rovná množství dodané světelné energie, která ovlivňuje vydatnost fotosyntézy, na které závisí růst a vývoj rostlin. Světelná intenzita také ovlivňuje vývoj a stavbu listu a množství chlorofylu obsaženého v listech. V kultivačních místnostech je světelná intenzita poskytnutá zářivkami poměrně nízká a explantáty proto obsahují menší koncentraci chlorofylu v listech. Díky nízkému obsahu chlorofylu v listech nejsou explantáty schopny plné autotrofie a nedostatek glukózy vznikající při fotosyntéze musí být dorovnán přísunem energie v podobě cukrů obsažených v kultivačních médiích [3], [5].

2.4. Kultivační média

2.5. Složení médií

Média, která se využívají při kultivaci buněk, rostlinných pletiv nebo orgánů, obvykle obsahují:

- makroelementy
- mikroelementy
- vitamíny
- aminokyseliny (nebo jiný zdroj organického dusíku)
- sacharidy
- další organické složky (aktivní uhlí)
- růstové regulátory
- (zpevňující látky)

Složení kultivačního média je jedním z faktorů, které nejvíce ovlivňují růst a morfogenezi (vývoj tvaru) explantátů. Médium je exogenním zdrojem fytohormonů (rostlinných hormonů) pro

explantáty, všechny jeho složky se navzájem ovlivňují a společně se podílejí na usměrňování procesů probíhajících v kultivovaných pletivech [3], [5].

2.5.1. Makroelementy

Do kultivačních médií se přidávají makroelementy, které zahrnují šest prvků důležitých pro vývoj rostliny: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru, z nichž dusík hraje nejdůležitější roli. Pro dosažení efektivního růstu je anorganický dusík do média přidáván v nitrátové formě a ve formě amonných solí a organický dusík ve formě aminokyselin [3].

2.5.2. Mikroelementy

Pro růst explantátových kultur jsou nezbytné tyto mikroelementy: železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden. Pro zlepšení růstu a vývoje kultur některých rostlin se mohou do médií přidávat i kobalt, jód, sodík a chlor, které však pro růst kultury nemusí být nezbytné. Mikroelementy se do médií přidávají ve stopovém množství [3].

2.5.3. Zdroj uhlíku a energie

Kvůli nedostatku chlorofylu v palisádovém parenchymu listů nejsou explantáty schopny autotrofní výživy. Z důvodů heterotrofie se do médií přidávají sacharidy, které nahrazují zdroje uhlíku a energie. Nejčastějším zdrojem uhlíku a energie je v médiu sacharóza. Sacharózu je v některých případech možné nahradit glukózou nebo fruktózou. Může být nahrazena i jinými sacharidy, ty ale byly prokázány jako méně efektivní než sacharóza a glukóza [3].

2.5.4. Vitamíny

Za normálních podmínek si rostlina vitamíny nezbytné ke svému růstu a vývoji syntetizuje sama. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné, protože katalyzují většinu metabolických procesů. V živných médiích se nejčastěji vyskytují vitamíny thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a sacharid myo-inositol. Thiamin, který je obsažen ve většině kultivačních médií, je jako vitamín nepostradatelný pro růst rostlinných pletiv, zatímco přítomnost kyseliny nikotinové, pyridoxinu a myo-inositolu v médiu není pro růst explantátu nezbytná, ale může ho stimulovat [3].

2.5.5. Fytohormony

Fytohormony neboli rostlinné hormony, jsou organické sloučeniny syntetizované v jedné části rostliny a zpravidla transportované do jiné části, kde i ve velmi malých koncentracích způsobují fyziologickou odpověď. Tato odpověď může působit na růst rostliny pozitivně, má tedy stimulační účinky nebo může růst rostliny brzdit inhibičními účinky. Do hlavních skupin fytohormonů patří: auxiny, cytokininy, gibereliny, etylen a kyselina abscisová [7].

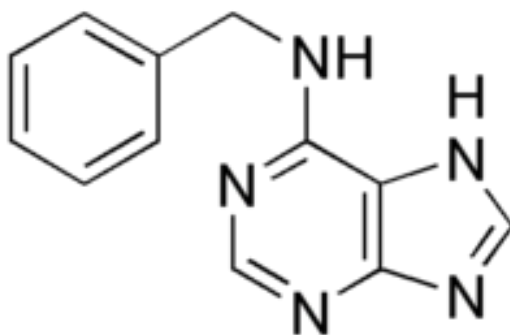
Růstové regulátory jsou chemicky syntetizované organické sloučeniny, které u rostlinných buněk způsobují podobnou fyziologickou odpověď jako fytohormony [8]. Při práci byly jako složky kultivačních médií použity pouze růstové regulátory na bázi cytokininů.

2.5.5.1. Cytokininy

N6-deriváty adeninu zvané cytokininy patří mezi fytohormony. Podle řetězce navázaného na N6 dusíku adeninu se dělí na isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní jsou reprezentovány cytokininy odvozenými od následujících bází: N6-(Δ^2 isopentenyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin. Mezi aromatické cytokininy patří 6-benzylaminopurin, meta- a ortho-topolin a jejich metabolity. Cytokininovou aktivitu vykazují také některé deriváty močoviny (např. N,N'-difenylmočovina, thidiazuron) [9], [10].

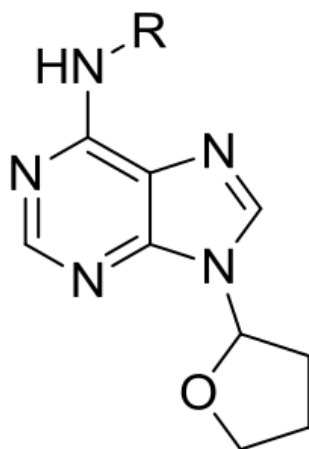
2.5.5.2. Struktura a charakteristika použitých cytokininů

Při práci byly použity 4 druhy cytokininů, konkrétně benzylaminopurin, meta-topolin a jejich deriváty. Mezi nejznámější a nejpoužívanější cytokininy přidávané do kultivačních médií patří benzylaminopurin. Toho bylo užito i při práci a v textu jsou na něj odkazy pod zkratkou BAP. K fyziologickým projevům BAPu patří zejména regenerace rostlin z kalusu a stimulace vývoje plodů a semen. Tyto účinky jsou způsobené stimulací buněčného dělení [11].



Obr. 2: 6-benzylaminopurin [12]

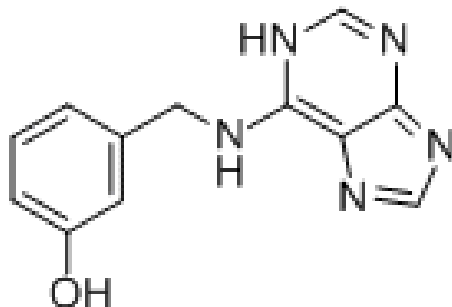
Dalším z použitých cytokininů byl 6-benzylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl-purin, derivát benzylaminopurinu. V práci ho najdeme pod zkratkou THPP. Nedávno vytvořené N9 deriváty, kterými jsou 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl purin (PBA) a 6-benzylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl purin (FBA), se projevily jako mnohem efektivnější než růstový regulátor BAP a proto se jich užívá při kultivaci [13].



THPP

Obr. 3: 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl-purin [13]

Hojně využívaný ke kultivaci je také meta-topolin a jeho deriváty. Odkazy na meta-topolin se v práci nachází pod zkratkou MT. Meta-topolin je hydroxy derivátem benzylaminopurinu a jeho účinkem dochází ke zvýšení hladiny enzymů obecně spojovaných s fotosyntetickým procesem v rostlině [14].



Obr. 4: Meta-topolin (3-hydroxybenzylaminopurin) [15]

Posledním z použitých cytokininů je derivát meta-topolinu, na který je v práci odkazováno pod zkratkou CEP (6-(3-methoxybenzylamino)purine-9-β-D-(6(3MeOBA)9CEP)). Tento derivát byl nedávno vyvinut pracovníky katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a odkoupen Agronomickou fakultou Mendelovy univerzity za účelem testování účinků tohoto derivátu při kultivaci rostlin. Účinky tohoto derivátu jsou prozatím ve stadiu výzkumu.

2.5.5.3. Historie cytokininů

Gottlieb Haberlandt (1913) zjistil, že látky obsažené ve floému rostliny mají schopnost indukovat buněčné dělení. První cytokinin byl izolovaný ze spermatu sledů. Bylo zjištěno, že tato látka stimuluje buněčné dělení – cytokinezi – a proto byla nazvána *kinetin*. První známý přirozený cytokinin byl objeven v nezralém endospermu kukuřice. Podle latinského názvu kukuřice – *Zea* – byl tento cytokinin pojmenován *zeatin* [7].

2.5.5.4. Vlastnosti cytokininů

Cytokiny jsou skupinou rostlinných hormonů odvozených od adeninu vyznačující se schopností stimulovat v přítomnosti auxinu buněčné dělení některých rostlinných tkáňových kultur. Vykazují další biologické účinky, z nichž zejména regulace organogeneze a regenerace rostlin má značný význam v biotechnologických aplikacích. Přirozené cytokiny jsou deriváty adeninu substituované v poloze N-6. Hladina cytokininů v rostlinných buňkách je regulována ostatními fytohormony, zejména auxinem. Hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou kořeny, odkud jsou cytokiny transportovány do nadzemní části xylémem [16].

2.5.5.5. Účinky cytokininů

Důležitým fyziologickým účinkem cytokininů je jejich schopnost v interakci s auxinem iniciovat diferenciaci pupenů a kořenů. Vysoký poměr koncentrací cytokininu a auxinu v kultivačním médiu stimuluje diferenciaci pupenů, zatímco nízký poměr koncentrací cytokininu a auxinu je příznivý pro iniciaci kořenů. Díky tomuto poznatku jsme schopni z jednotlivých buněk a protoplastů regenerovat celou rostlinu. Důležitými biologickými účinky cytokininů jsou:

- stimulace větvení stonků a odnožování rostlin při potlačení dominance apikálního pupene nebo hlavního stonku
- zpomalení stárnutí rostlinných pletiv a orgánů
- stimulace diferenciaci plastidů a tvorby chlorofylu a škrobu
- zvýšení rezistence rostlin vůči extrémním podmínkám prostředí (vysoká teplota, zasolení a zaplavení kořenů)
- iniciace tvorby semen.

Současně zvyšují období fotosyntetické produktivity rostlin.

Cytokiny bývají do kultivačních médií většinou přidávány v kombinaci s auxiny. Mohou však působit i samotné, alespoň v některých fázích kultivace, nebo může jejich účinek silně převládat. Samy o sobě mohou cytokiny nacházet uplatnění při indukci tvorby prýtlů. Při dlouhodobějším působení cytokiny negativně ovlivňují růst explantátů a značně znesnadňují následné zakořeňování.

Hlavním účelem užívání cytokininů v kultivačním médiích je tedy stimulace buněčného dělení, indukce tvorby prýtlů a inhibice tvorby kořenů [16], [8].

2.5.6. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Kultivované explantáty jsou, na rozdíl od jiných složek obsažených v médiu, schopny syntetizovat vlastní aminokyseliny. Přítomnost aminokyselin v médiu však může stimulovat růst explantátů a znamená pro buňky bezprostřední zdroj dusíku, který je v organické formě využíván rychleji než ve formě anorganické. Do živných médií je dusík v organické formě nejčastěji dodáván ve směsi aminokyselin. Pokud by totiž aminokyseliny byly dodávány samotné, mohly by při vyšších koncentracích výrazně inhibovat růst explantátu [3].

2.5.7. Nedefinované organické složky médií

Hlavní složka, řadící se do této kategorie, je aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Tři základní funkce aktivního uhlí v kultivačním médiu jsou:

- absorpce látek inhibujících růst
- absorpce růstových regulátorů
- způsobení ztmavnutí média.

Ačkoli se aktivní uhlí přidává do kultivačního média i jako zdroj organického uhlíku pro stimulaci růstu, může v některých případech kvůli své schopnosti absorbovat růstové regulátory růst inhibovat. Stimulační účinek aktivního uhlí na růst explantátů spočívá hlavně v jeho schopnosti vázat toxické sloučeniny produkované rostoucím explantátem. Aktivní uhlí se obvykle před použitím propláchně kyselinou a zneutralizuje [3].

2.5.8. Látky používané pro zpevnění média

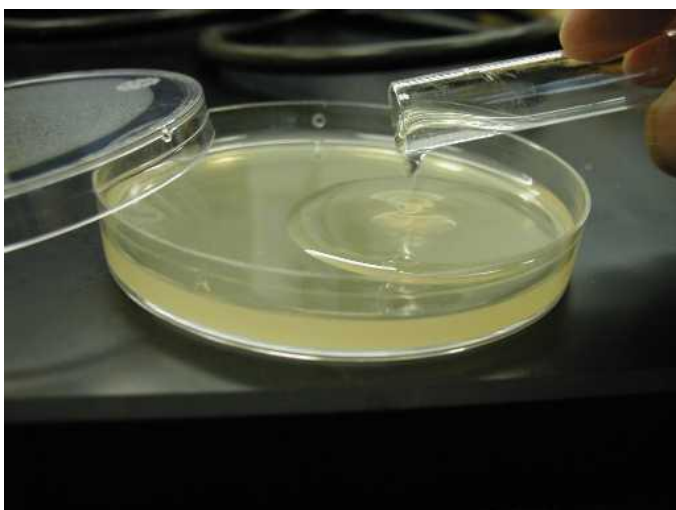
Rychlost růstu a produkce prýtků během mikropropagace může být ovlivněna fyzikálním stavem média. Explantátové kultury mohou být kultivované na tekutém médiu nebo na polotuhém médiu.

Při práci na středoškolské odborné činnosti bylo po celou dobu kultivace užíváno polotuhé médium, jehož výhodou je stabilizace polohy a lokalizace explantátu. Pro naši potřebu indukce tvorby prýtků se tekuté médium nehodí, protože při iniciaci tvorby prýtků bývá růst dezorientovaný a pokud proběhne úspěšně, bývá obtížné prýty oddělit.

Polotuhá média jsou taková média, jejichž viskozita a pevnost je někde mezi hodnotami pro pevné a kapalné skupenství [5]. Pro přípravu polotuhých médií se nejčastěji používá agar, přírodní polysacharid vyskytující se v červených mořských řasách. Agar je ideální jako živné médium pro kultivaci mikroorganismů a rostlin díky své vysoké gelující schopnosti. Oproti jiným gelizujícím látkám má agar řadu výhod: agarové gely jsou stabilní při teplotách používaných při kultivaci; agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy; tuhost agarového gelu je možné regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH kultivačního média. Agar obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík, a proto může být koncentrace některých prvků v živném médiu ovlivněna koncentrací agaru.

Užití polotuhého média však nemusí být vždy přínosem, některé druhy agaru totiž obsahují látky, které fungují jako inhibitory a mohou bránit morfogenezi nebo snižovat tempo růstu. Dalším problémem při užití polotuhého média může být špatná průchodnost kyslíku k vyvíjejícím se kořenům, což ovlivňuje jejich růst a funkčnost.

Použití tekutých médií může znamenat rychlejší růst, než jakého jsme schopni dosáhnout u polotuhých médií. Explantáty se většinou ponořují hlouběji do tekutého média tak, že je větší část povrchu explantátu v kontaktu s médiem, což zvyšuje účinnost obsažených látek, především regulátorů růstu. Pro stimulaci růstu explantátu je nutné, aby byl zajištěn přísun kyslíku, proto musí mít explantát v tekutém médiu nějakou oporu, která udržuje jeho část nad hladinou média [3], [5].



Obr. 5: Kultivační médium s agarem [16]

2.6. Kultivační nádoba

Experimentálními pokusy bylo prokázáno, že výtěžnost mikropropagace závisí i na vlivu kultivační nádoby. Faktory, které ovlivňují kultivaci, jsou vzájemný vliv použitého druhu média a propustného uzávěru kultivační nádoby; objem nádoby a tvar nádoby, který může mít vliv na rychlost růstu kultur ovlivněním propustnosti plynů [5].

Při práci na středoškolské odborné činnosti bylo užito plastových nádob Magenta® (výrobce Sigma), které mají hranatý tvar a plastové závěrné víčko, umožňující vstup kyslíku. Rozměry těchto nádob jsou 77×77×97 mm.



Obr. 6: Kultivační nádoba Magenta® s explantáty (vlastní zdroj)

2.7. Moruše černá



Obr. 7: Moruše černá [18]



Obr. 8: Explantát moruše černé
(vlastní zdroj)

2.7.1. Morfologie moruše

Moruše (morušovník) patří do řádu růžotvaré (Rosales), čeledi morušovníkovité (Moraceae). Moruše se může vyskytovat v podobě stromu s kmenem vysokým až 10 m, jako dřevina nebo jako keř. Má opadavé, srdčité, široké, sytě zelené, lesklé listy zoubkaté při krajích, které dosahují až 15 cm. Moruše patří do stejné čeledi jako fíkovník, což se na některých listech projeví tvorbou nepravidelně hlubokých laloků. Řapík je krátký, tlustý, čepel široce vejčitá, celistvá nebo až hluboce nepravidelně vykrajovaná, na rubu hustě chlupatá. Před opadáním listy mění barvu na žlutou. Plodem morušovníku je souplodí peckoviček – moruše. Od poloviny léta dozrávají na moruši podlouhlé plody podobné protáhlým ostružinám, které jsou při úplném dozrání černé a lesklé. Plody mají válcovitý tvar a vyrůstají na větvičkách ve skupinách. Květy moruše mají růžovou barvu a tvar samčích i samičích květů je jehněda. Moruše kvete od května do června. Rostlina je jednodomá a samosprašná, to znamená, že ke tvorbě plodů nepotřebuje opylovače. Celá rostlina je prostoupena mléčnicemi s bílým latexem [19], [20].

2.7.2. Výskyt moruše

Morušovník černý pochází pravděpodobně z Íránu a pěstuje se již od starověku v různých zemích Středozeří. Roste na slunných svazích ve velmi teplých, nejčastěji vinorodých oblastech. Kdysi se vzácně pěstoval i v Čechách, při tuhých mrazech totiž vymrzá. Jednotlivě se dosud vyskytuje na Moravě, častěji ve vinorodých oblastech Slovenska. Půda může být mírně kyselá až mírně alkalická a propustná, nesnášejí však přemokření. Moruše je dřevina, která pro dobrý růst a výnosy potřebuje teplé stanoviště a co nejvíce slunce. Dobře snáší znečištěné ovzduší [19], [20].

2.7.3. Ostatní odrůdy moruše

Příbuzný morušovník bílý (*Morus alba*), pocházející z Číny, se kdysi často pěstoval i v České republice. Z morušovníků je nejvyšší, dorůstá až 18 m. Vytváří kolem 10 m širokou, kulatou korunu. Jeho plodenství jsou velká až 2,5 cm mají bílou až jemně narůžovělou barvu. Dozrávají v červenci a srpnu. Tomuto stromu vyhovuje spíše sušší stanoviště, nevdí mu větrná poloha. Je mrazuvzdorný až do -35 °C.

Morušovník červený je na rozdíl od bílého a černého dvoudomý, proto je nutné pěstovat samčí i samičí strom. Vzrůst je podobný jako u morušovníku černého. Jeho až 3 cm dlouhé plodenství má tmavě purpurovou barvu a chutná sladce. Dozrává v červenci a srpnu [20].

2.7.4. Užití moruše

Strom poskytuje kvalitní sladkokyselé ovoce, šťáva s velkým obsahem vitamínu C má i protizánětlivé účinky při onemocnění ústní dutiny. Zajímavostí je, že celá rostlina je léčivá. Listy se používají proti nemocem z nachlazení, plody mají výrazný tonizující účinek na ledviny a močové cesty a zabraňují předčasnému šednutí vlasů, a kořeny se užívají například proti astmatu, hypertenzi a dokonce diabetu. Listy moruše bílé jsou výhradní potravou bource morušového a pěstují se v oblastech, kde se vyrábí hedvábí [20].

2.8. Laminární box

Laminární box, jinak také flow box, je laboratorní zařízení, které filtruje vzduch pomocí filtrů a nabízí tak možnost pracovat ve sterilním prostředí bez mikroorganismů [21]. Užívá se nejen při kultivaci rostlinného materiálu, ale také např. při kultivaci živočišných buněk.

2.9. Autokláv

Autokláv je laboratorní zařízení užívané ke sterilizaci. Jedná se o sterilizaci horkou parou za zvýšeného tlaku. Tento způsob sterilizace se používá pro sterilizaci vatových zátek, plastických uzávěrů, filtrů, skla, pipet a především pro sterilizaci kultivačních médií. Sterilizace se provádí při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizace je u médií závislá na jejich objemu, u ostatního materiálu se používá doba 15–20 minut [3].

3. *Materiál a metodika*

3.1. **Moruše černá (*Morus nigra*)**

Materiál na práci byl odebrán z kultivovaných mateřských rostlin moruše černé *in vitro*, jejichž poslední přepasážování na nové médium proběhlo 16. 8. 2012. Tyto explantáty byly kultivovány v kultivační místnosti Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity pod dohledem Ing. Heleny Vlašínové, Ph.D. Celkově byly na založení kultur použity dvě kultivační nádoby mateřských rostlin.

3.2. **Kultivace moruší**

Kultivace explantátů moruše černé byla započata 14. 9. 2012. Materiál odebraný ze dvou kultivačních nádob mateřských rostlin byl přepasážován do celkově deseti kultivačních nádob, z nichž vždy dvě nádoby obsahovaly stejný cytokinin přidáný do kultivačního média. Pro kontrolu a porovnání růstu explantátů byly moruše přepasážovány i na médium prosté cytokininů (proces kultivace viz. kapitola 2.2.1.).

Kultury explantátů byly kultivovány po celkovou dobu 77 dnů, za niž byly jednou přepasážovány na nové živné médium stejného složení (26. 10. 2012) a po uplynutí této doby byly kultury přepasážovány na médium prosté cytokininů. Při procesu kultivace byly dodrženy všechny kultivační podmínky, explantáty byly pasážovány v aseptických podmínkách laminárního boxu a kultivovány v kultivační místnosti.

3.3. **Použité regulátory růstu**

| CYTOKININY UŽITÉ V ŽIVNÉM MÉDIU | | |
|---------------------------------|-------------|--|
| ZKRATKA | KONCENTRACE | NÁZEV |
| 0 | 0 | kontrola (bez cytokininů) |
| CEP | 10 μ M | 6-(3-methoxybenzylamino)purine-9- β -D |
| BAP | 10 μ M | 6-benzylaminopurin |
| MT | 10 μ M | 3-hydroxybenzylaminopurin |
| THPP | 10 μ M | 6-benzylamino-9-tetrahydrofuran-2-yl-purin |

Tabulka 1: Přehled cytokininů použitých v živném médiu

V této tabulce jsou zaznamenány 4 látky cytokininové povahy, které byly při práci přidávány do živného média jako stimulanty růstu.

3.4. **Kultivační médium**

Ke kultivaci bylo použito médium WPM (McCown Woody Plant Medium – firmy Duchefa). Složení použitého média uvádí tab. 1.

Příprava 1 litru kultivačního média probíhala následovně: 2,46 g média, 100 mg inositolu a 200 mg casein hydrolyzátu bylo rozpuštěno v kádince s 800 ml destilované vody. Následně bylo upraveno pH vzniklého roztoku (pH-metr Schott CG 842) na hodnotu 5,5–5,8 pomocí 0,1M hydroxidu draselného (KOH) a 0,1M kyseliny chlorovodíkové (HCl). K médiu bylo přidáno 7 g rozvařeného agaru a 20 g sacharosu. Po promíchání bylo médium sterilizováno v autoklávu (Tuttnauer 3870 EA) při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 30 minut. Ve flow-boxu byly přidány do chladnouceho média příslušné druhy cytokininů, sterilizované filtrací (0,2 µm). Následně bylo každé médium doplněno do 1000 ml, promícháno a rozlito do připravených v autoklávu vysterilizovaných plastových nádob typu Magenta (Sigma) – 50 ml do každé nádoby. Po ztuhnutí bylo médium přeneseno do kultivační místnosti, kde bylo uchovááno ve tmě až do doby použití. Kultivační médium připravovala laborantka Mendelovy univerzity.

| Složky média | Koncentrace (mg/l) | Mikroelementy | Koncentrace (mg/l) | Vitamíny | Koncentrace (mg/l) |
|--|--------------------|---|--------------------|---------------------|--------------------|
| CaCl ₂ | 72,50 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,25 | glycin | 2,0 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O | 471,26 | FeNaEDTA | 36,70 | myo-inositol | 100,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,0 | H ₃ BO ₃ | 6,20 | nikotinová kyselina | 0,50 |
| K ₂ SO ₄ | 990,0 | MnSO ₄ ·H ₂ O | 22,30 | pyridoxin HCl | 0,50 |
| MgSO ₄ | 180,54 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,25 | | |
| NH ₄ NO ₃ | 400,0 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8,60 | | |

Tabulka 2: Složení kultivačního média McCown Woody Plant Medium

3.5. Autoklávování

Kultivační média byla připravována laborantkou Agronomické fakulty Mendelovy univerzity a sterilizována v autoklávu. Sterilizovány byly vždy kultivační nádoby, do kterých po přepasážování nebyly vráceny explantáty a obsahovaly pouze zbytky použitého kultivačního média nebo kultivační nádoby, které v průběhu kultivace zkontaminovaly.

3.6. Sterilita prostředí při práci

Před jakoukoli manipulací s explantáty, která vyžadovala otevření kultivační nádoby, bylo třeba si důkladně umýt ruce, aby nedošlo ke kontaminaci explantátů. Bylo nezbytné, aby tyto manipulace probíhaly v laminárním boxu, který zajišťuje aseptické prostředí při pasážování a chrání explantáty před mikroorganismy přenášenými vzduchem. Před každým pasážováním na nové kultivační médium byla provedena sterilizace laminárního boxu 70% etanolem.

Kovové nástroje, sklo, hliníková fólie atd. byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru (130–170 °C) po dobu 2–4 hodin [3]. Veškeré předměty, které se takto sterilizovaly, byly pro sterilizování zabaleny do alobalu. Při práci byly nástroje opakovaně sterilizovány opálením nad plamenem kahanu přímo v laminárním boxu a po vychladnutí používány.

3.7. Kultivační nástroje a pomůcky

Kromě laminárního boxu byly při práci použity tyto nástroje a pomůcky: ramínko na odkládání nástrojů, nůžky, pinzeta, skalpel, plynový kahan, Petriho misky a filtrační papíry. Všechny kovové nástroje byly před každou prací sterilizovány horkovzdušným sterilizátorem a během práce byly sterilizovány vyžháním nad plamenem kahanu.

3.8. Zařízení laboratoře explantátových kultur

Laboratoř, ve které byly explantátové kultury pasážovány, obsahovala základní kultivační zařízení. Jedná se o: prostor na mytí skla a laboratorních pomůcek, prostor na přípravu a sterilizaci médií (autokláv), skladovací prostor na chemikálie a sklo, aseptický prostor pro očkování (laminární box) a kultivační místnost nebo box s řízenými kultivačními podmínkami (teplota, vlhkost, světlo) [3].

3.9. Laminární box

Při otevřené manipulaci s explantáty a při přepasážování byl používán laminární box. Veškerá manipulace s explantáty probíhala v aseptickém laminárním boxu Holten Lamin Air, který byl před započítím práce nechán minimálně 15 minut spuštěný a pak byly horní, boční stěny a pracovní plocha dezinfikovány 70% etanolem.



Obr. 9: Laminární box [23]

3.10. Kultivační místnost

Kultivační místnost na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity je vybavena několika regály se zářivkami na uskladnění kultivačních nádob, lednicí a třepačkami. Kultivační nádoby byly po celou dobu kultivace skladovány v kultivační místnosti s regulovatelnou teplotou ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), regulovatelným osvětlením a aseptickým prostředím.



Obr. 10: Kultivační místnost Agronomické fakulty Mendelovy univerzity
(vlastní zdroj)

3.11. Postup práce

Mateřské rostliny moruše, z nichž byly explantáty odebrány, byly vytaženy z kultivačního média na Petriho misku s filtračním papírem. Jednotlivé prýty mateřské rostliny byly odděleny od sebe, uříznuty nad kořenovým systémem a zbaveny listů. Poté byly skalpelem rozděleny na několik segmentů u postranních pupenů a přepasážovány na nové kultivační médium.

Kultivační nádoby byly poté popsány čísly 1–10 (1,2 – kontrolní médium; 3,4 – CEP médium, 5,6 – BAP médium; 7,8 – MT médium; 9, 10 – THPP médium). Po přepasážování byly kultivační nádoby s explantáty přemístěny do kultivační místnosti.

Pozorované parametry:

- délka a počet nově vzniklých kořínků a schopnost explantátu zakořenit
- výška prýtků explantátů
- počet nově diferenciovaných prýtků
- velikost kalusu explantátů (kalus je hojivé pletivo parenchymatických buněk, které se tvoří při regeneraci poškozených částí rostliny [21] – po odříznutí prýtu nad kořenovým systémem)
- zbarvení listů, které vypovídá o fotosyntetické schopnosti rostliny

První pozorování po započetí kultivace proběhlo 5. 10. 2012. Pozorována byla výška prýtků, počet nově diferenciovaných prýtků, velikost kalusu, délka a počet kořínků a barva listů. Výsledky byly zapsány a kultivační nádoby vráceny do kultivační místnosti.

Další pozorování proběhlo 26. 10. 2012 a explantáty byly přepasážovány na nová kultivační média s cytokininy. Opět bylo provedeno rozdělení nově diferenciovaných prýtků a ty byly umístěny na kultivační média. Prýty byly zbaveny kořínků, které se těžko pasážují na nové kultivační médium a mohou být případným zdrojem kontaminace kvůli obtížné manipulaci. Pozorovány byly stejné parametry jako při předchozím měření.

Dne 16. 11. 2012 bylo provedeno další pozorování. Pozorovány a zapsány byly obdobné parametry jako při předchozích měřeních. Zjištěna byla kontaminace v kultivační nádobě č. 1. Explantáty v kultivační nádobě byly zlikvidovány a nádoba s kultivačním médiem byla umístěna do autoklávu na sterilizaci.

Dne 30. 11. 2012 proběhlo poslední pozorování explantátů na médiích s cytokininy. Pozorována byla výška prýtků, počet nově diferenciovaných prýtků, velikost kalusu, délka a počet kořínků a barva listů a výsledky ze všech pozorování byly zpracovány do grafů. Od začátku kultivace bylo dohromady nakultivováno 19 kultivačních nádob explantátů. Byla zjištěna kontaminace v kultivačních nádobách č. 3, 4 a 10, které byly poté sterilizovány v autoklávu. Explantáty ze zbylých kultivačních nádob byly přepasážovány na médium prosté cytokininů s aktivním uhlím.

Po přepasážování na médium prosté cytokininů byla provedena ještě dvě pozorování, 14. 12. 2012 a 11. 1. 2013. Při těchto pozorováních byla měřena délka a počet kořínků explantátů a zkoumána jejich schopnost zakořenit.

4. Výsledky

V následujících grafech jsou zaznamenány výsledky měření:

- výšky diferenciovaných prýtků
- délky diferenciovaných kořínků
- počtu diferenciovaných prýtků
- velikosti vzniklého kalusu
- barvy listů explantátů
- délky kořínků po přepasážování na médium prosté cytokininů

4.1. Výsledky měření

4.1.1. Výsledky měření průměrné délky a počtu kořínků

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| kontrolní | 21 DNÍ | 9 | 0,50 | 0,74 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 1,40 | 7,51 cm |
| | 63 DNÍ | 12 | 0,75 | 1,46 cm |
| | 77 DNÍ | 12 | 1,50 | 7,32 cm |

Tabulka 3: Průměrná délka a počet kořínků na kontrolním médiu

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| CEP | 21 DNÍ | 9 | 0,70 | 0,62 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 1,20 | 4,19 cm |
| | 63 DNÍ | 9 | 1,30 | 3,57 cm |
| | 77 DNÍ | 6 | 3,0 | 10,76 cm |

Tabulka 4: Průměrná délka a počet kořínků na médiu s CEP

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| BAP | 21 DNÍ | 10 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 63 DNÍ | 9 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 77 DNÍ | 9 | 0,0 | 0,0 cm |

Tabulka 5: Průměrná délka a počet kořínků na médiu s BAP

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| MT | 21 DNÍ | 9 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 63 DNÍ | 8 | 0,0 | 0,0 cm |
| | 77 DNÍ | 8 | 0,0 | 0,0 cm |

Tabulka 6: Průměrná délka a počet kořínků na médiu s MT

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|--|--|
| THPP | 21 DNÍ | 10 | 0,20 | 0,29 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 0,30 | 1,66 cm |
| | 63 DNÍ | 8 | 0,75 | 0,49 cm |
| | 77 DNÍ | 6 | 1,50 | 2,31 cm |

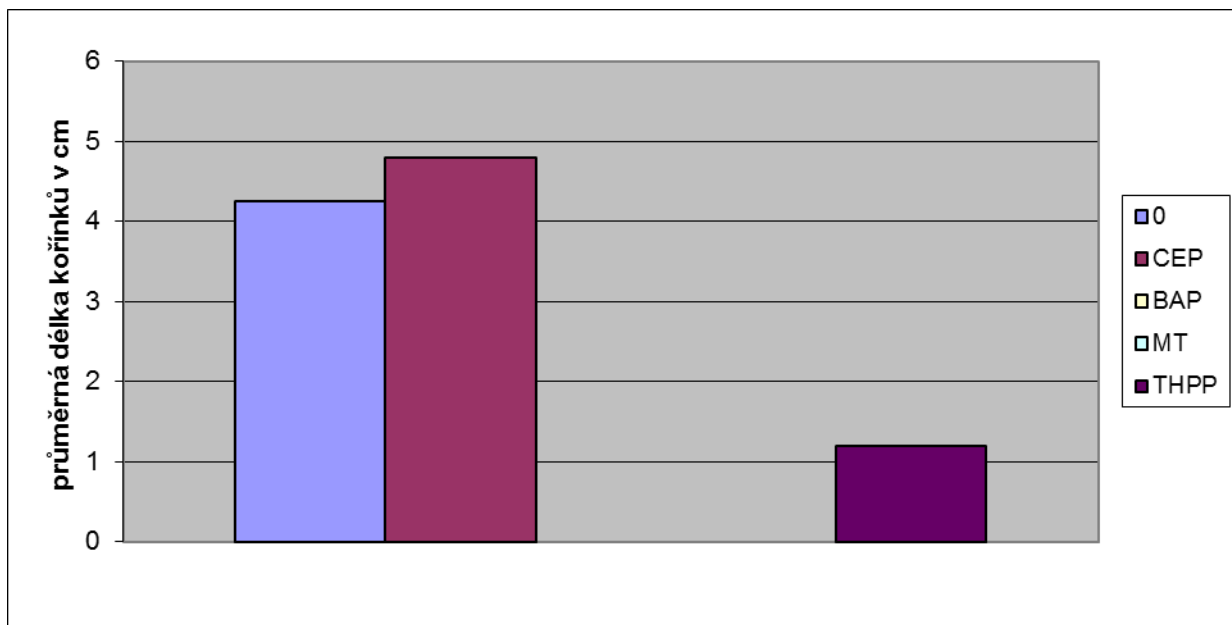
Tabulka 7: Průměrná délka a počet kořínků na médiu s THPP

V prvních 21 dnech kultivace došlo na rostlinách z médií s BAP a MT k úplné inhibici růstu kořínků. Nejdelsí kořínky byly zaznamenány na kontrolním médiu. Nejvyšší počet kořínků byl zaznamenán u prýtků, vzniklých na médiu s CEP.

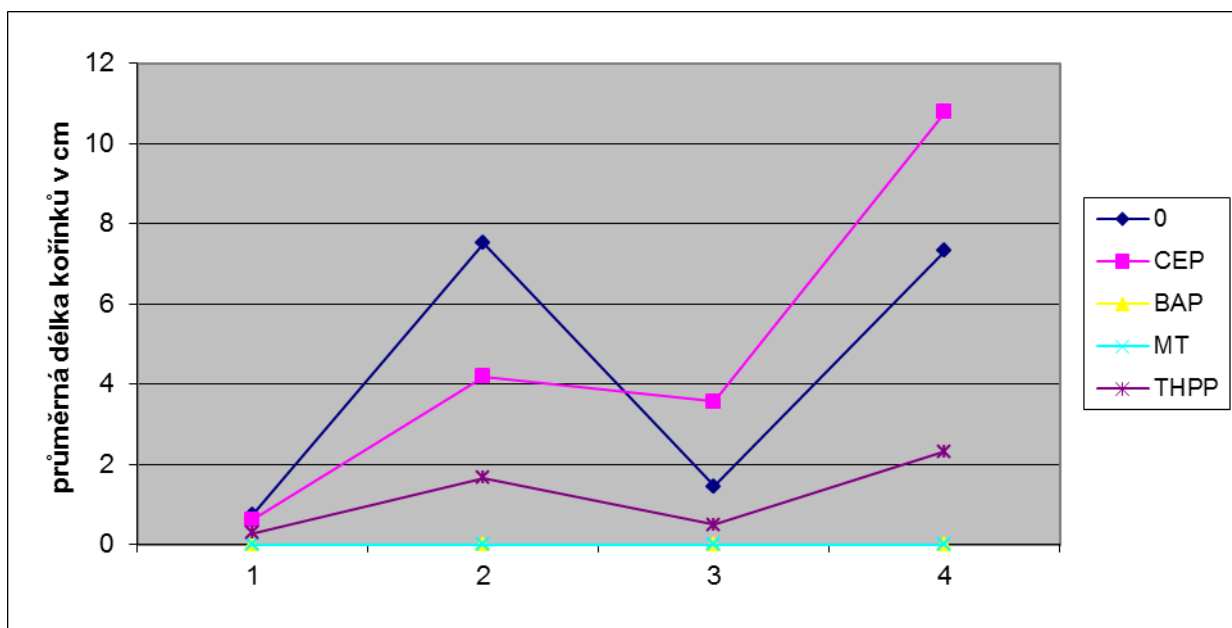
Po 42 dnech kultivace se nejdelsí kořínky diferenciovaly na kontrolním médiu a nejkratší průměrná délka kořínků byla naměřena na médiu s THPP. Na médiích s BAP a MT se opět žádné kořínky nediferenciovaly. Nejvíce kořínků bylo naměřeno na kontrolním médiu.

Po 63 dnech kultivace se na médiích s BAP a MT ani po přepasázování neprojevíly žádné stimulační účinky cytokininů a nediferenciovaly se žádné kořínky, naopak na médiu s CEP byl růst kořínků stimulován. Nejdelsí kořínky byly naměřeny na médiu s CEP a také na tomto médiu bylo stimulováno nejvíce kořínků.

Po 77 dnech byly výsledkem kultivace tyto poznatky: nejdelsí kořínky stimulovány na médiu s CEP a nejkratší průměrná délka kořínků byla naměřena na médiu s THPP. Nejvíce kořínků bylo zaznamenáno na médiu s CEP a na médiích s BAP a MT nebyly zaznamenány žádné kořínky.



Graf 1: Celkový průměr délky kořínků explantátů za celou dobu kultivace



Graf 2: Délka kořínků v průběhu kultivace během 77 kultivačních dnů

Od začátku kultivace se projevovaly výrazné inhibiční účinky BAP a MT na růst kořínků. To mohlo být způsobeno tím, že tyto cytokininy zároveň indukovaly tvorbu kalusu, který může způsobit odlamování kořínků. Po celou dobu kultivace se na těchto médiích nediferenciovaly žádné kořínky. Na médiu s THPP byly pozorovány dlouhé kořínky, kterých však bylo málo, výsledná průměrná délka kořínků v přepočtu na explantát se tedy jeví kratší. Pozitivní stimulační účinky se projevily na médiu s CEP, na němž byly pozorovány četné a dlouhé kořínky s kořenovým vlášením. Podobné výsledky byly pozorovány na kontrolním médiu. Účinkem cytokininů přidaných do kultivačního média může při dlouhodobějším působením dojít k inhibici diferenciaci a růstu

kořenů. V grafu můžeme pozorovat výrazný propad v naměřené délce kořínků. Ten byl způsobený přepasážením na nové médium, kdy byly prýty explantátů odděleny od sebe a zbaveny kořínků.

4.1.2. Fotodokumentace kořenového systému explantátů



Obr. 11: Kořenový systém explantátů na kontrolním médiu (vlastní zdroj)



Obr. 12: Kořenový systém explantátů na médiu s CEP (vlastní zdroj)



Obr. 13: Kořenový systém explantátů na médiu s BAP (vlastní zdroj)



Obr. 14: Kořenový systém explantátů na médiu s MT (vlastní zdroj)



Obr. 15: Kořenový systém explantátů na médiu s THPP (vlastní zdroj)

Na fotografiích můžeme vidět kořenové systémy explantátů. Na médiu s CEP (obr. 12) můžeme pozorovat velký počet dlouhých kořínků, naopak na kontrolním médiu (obr. 11) vidíme menší počet kořínků s kořenovým vlášením (stejně tak na médiu s THPP – obr. 15). Na obr. 13 a 14 nepozorujeme žádné kořeny, protože na médiu s BAP a MT se žádné netvořily.

4.1.3. Výsledky měření průměrné výšky a počtu nově diferenciovaných prýtků

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ VÝŠKA PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| kontrolní | 21 DNÍ | 9 | 0,70 | 1,86 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 1,80 | 2,20 cm |
| | 63 DNÍ | 12 | 1,30 | 2,27 cm |
| | 77 DNÍ | 12 | 1,50 | 2,33 cm |

Tabulka 8: Průměrná výška a počet prýtků na kontrolním médiu

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ VÝŠKA PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| CEP | 21 DNÍ | 9 | 1,1 | 1,57 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 2,1 | 1,80 cm |
| | 63 DNÍ | 9 | 1,7 | 2,05 cm |
| | 77 DNÍ | 6 | 2,5 | 2,80 cm |

Tabulka 9: Průměrná výška a počet prýtků na médiu s CEP

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ VÝŠKA PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| BAP | 21 DNÍ | 10 | 2,30 | 0,35 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 3,80 | 0,58 cm |
| | 63 DNÍ | 9 | 3,80 | 0,69 cm |
| | 77 DNÍ | 9 | 5,50 | 0,70 cm |

Tabulka 10: Průměrná výška a počet prýtků na médiu s BAP

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ VÝŠKA PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| MT | 21 DNÍ | 9 | 1,60 | 0,33 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 3,80 | 0,40 cm |
| | 63 DNÍ | 8 | 4,38 | 0,44 cm |
| | 77 DNÍ | 8 | 6,13 | 0,49 cm |

Tabulka 11: Průměrná výška a počet prýtků na médiu s MT

| DRUH MÉDIA | POČET DNÍ KULTIVACE | POČET ROSTLIN V KULTIVAČNÍCH NÁDOBÁCH | PRŮMĚRNÝ POČET PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ VÝŠKA PRÝTKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| THPP | 21 DNÍ | 10 | 0,80 | 1,38 cm |
| | 42 DNÍ | 9 | 2,10 | 1,41 cm |
| | 63 DNÍ | 8 | 3,0 | 1,53 cm |
| | 77 DNÍ | 6 | 3,30 | 1,83 cm |

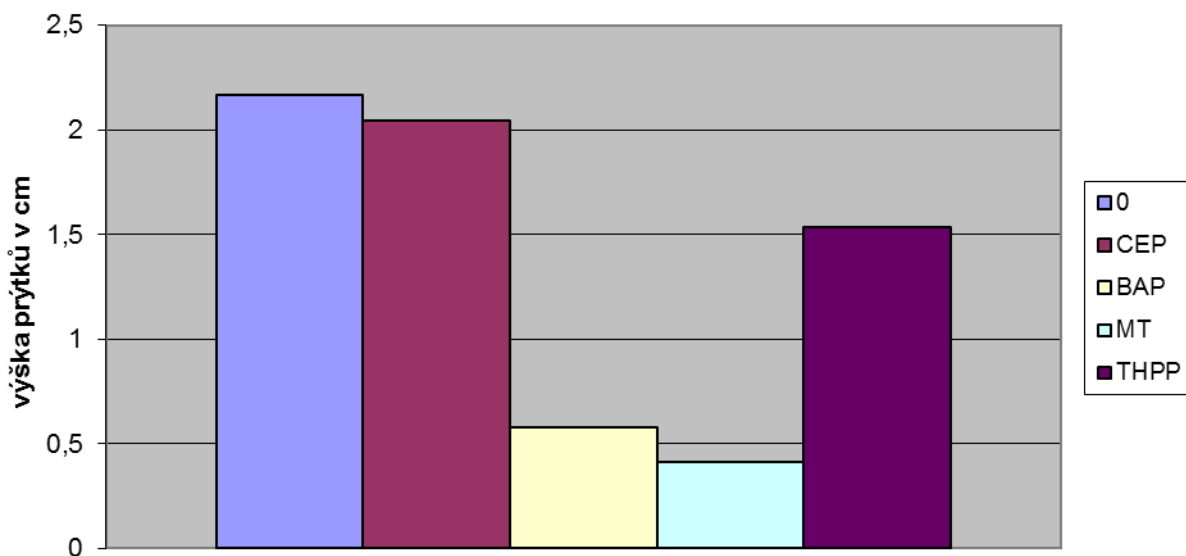
Tabulka 12: Průměrná výška a počet prýtků na médiu s THPP

Po prvních 21 dnech kultivace se nejvyšší prýtky diferenciovaly na kontrolním médiu a nejmenší na médiu s MT. Při prvním pozorování kultivačních explantátů nebyl počet diferenciovaných prýtků ještě příliš vysoký. Průměrný počet nově diferenciovaných prýtků se na všech médiích pohybuje okolo 1–2.

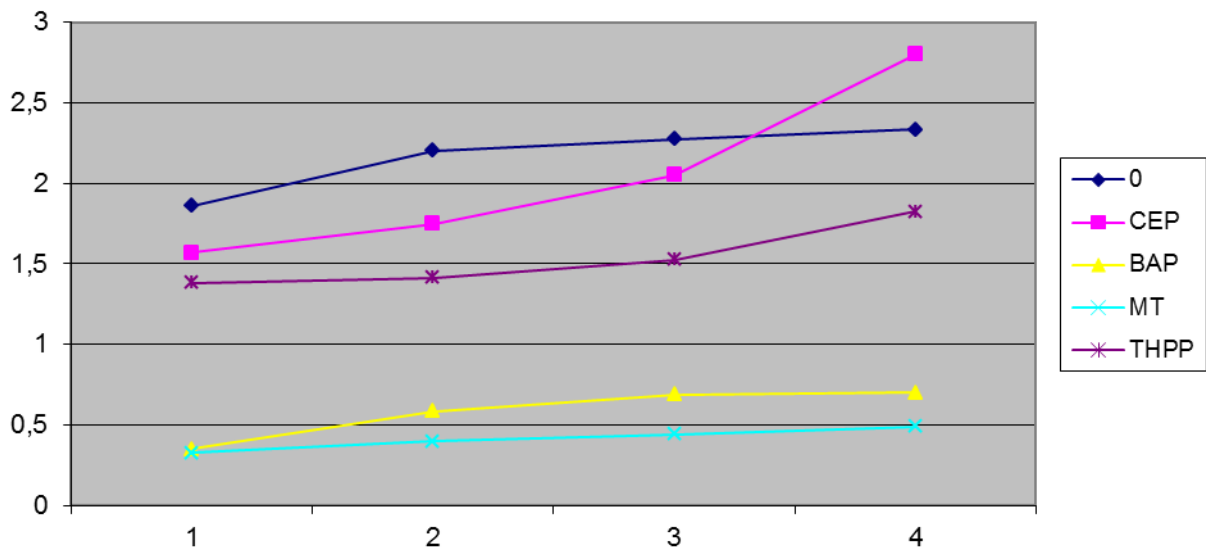
Po 42 dnech kultivace zapůsobily zejména BAP a MT, které způsobily výraznou inhibici růstu prýtků. Byla pozorována také mírná inhibice způsobená CEP a THPP, výška prýtků na kontrolním médiu se výrazně nezměnila. Na tvorbu prýtků měly stimulační účinky hlavně BAP a MT.

Explantáty byly přepasážovány na nové médium 26. 10. 2012. Po 63 dnech kultivace, 21 dní po přepasážování, byly nejvyšší prýtky pozorovány na kontrolním médiu a nejmenší na médiu s MT, který na růst prýtků působil inhibičními účinky. Největší stimulační účinky na tvorbu prýtků měl MT a BAP, nejméně prýtků na diferenciovalo na kontrolním médiu.

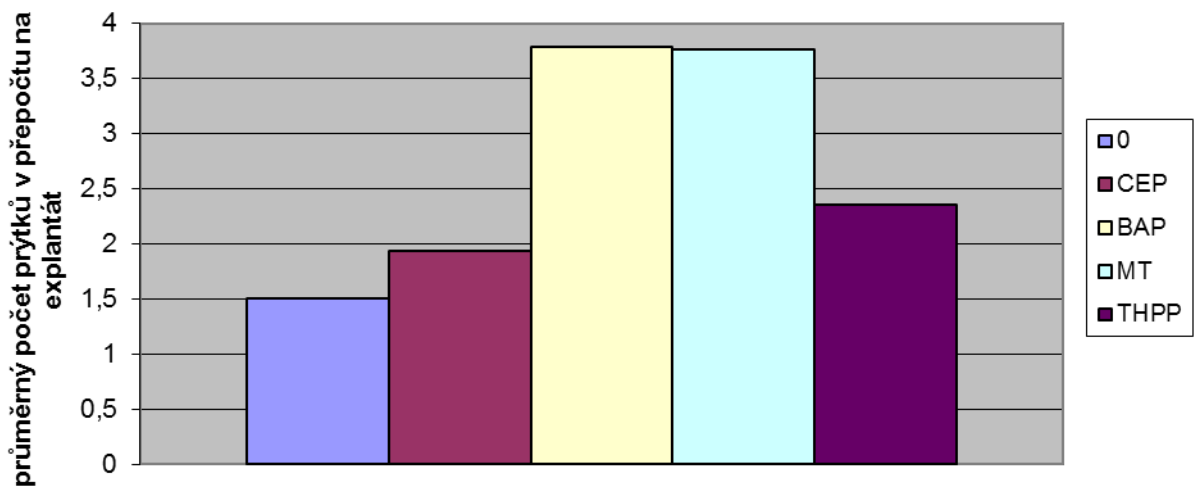
Po 77 dnech kultivace stále působil nejvýraznějšími inhibičními účinky MT a nejvyšší prýtky se diferenciovaly na médiu s CEP. Při pozorování se opět ukázalo, že u kultivovaných kultur má BAP a MT stimulační účinky na tvorbu nových prýtků. Velmi nízký počet nově vzniklých prýtků byl pozorován na kontrolním médiu.



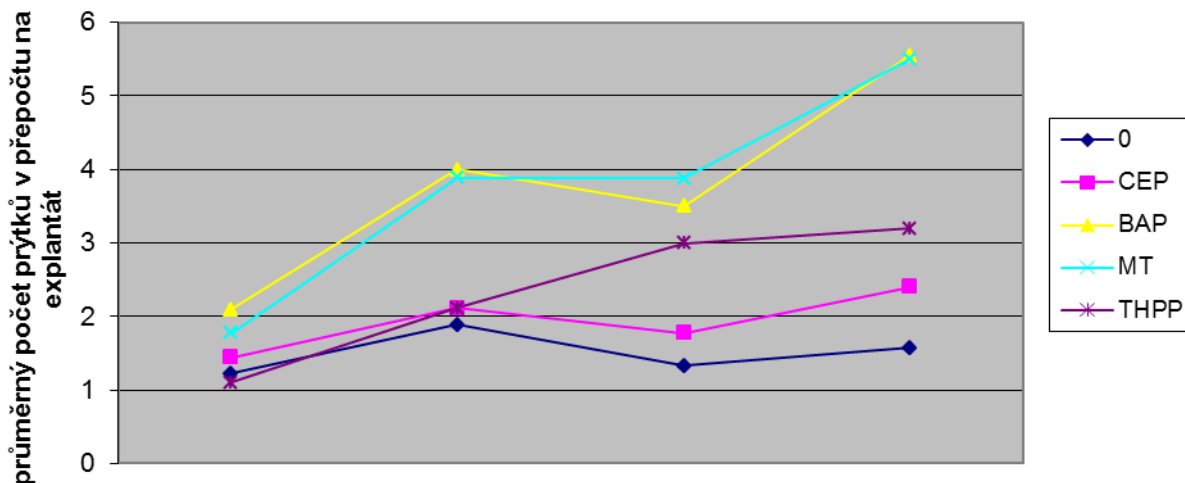
Graf 3: Celkový průměr výšky prýtků explantátů za celou dobu kultivace



Graf 4: Výška prýtků v průběhu kultivace během 77 kultivačních dnů



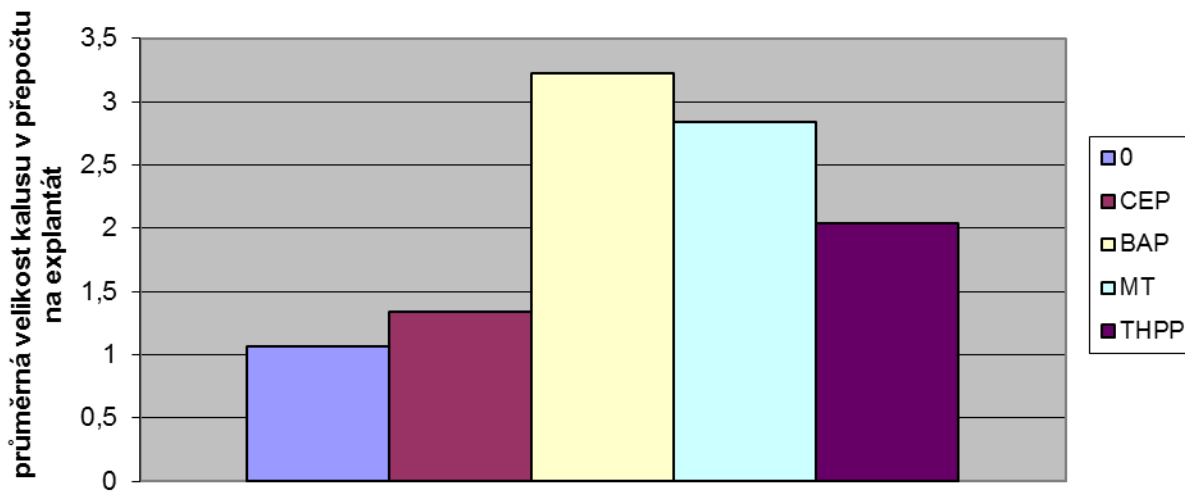
Graf 5: Celkový průměr počtu prýtků explantátů za celou dobu kultivace



Graf 6: Počet prýtků v průběhu kultivace během 77 kultivačních dnů

Na začátku kultivace se největší stimulační účinky na růst prýtků projevily na kontrolním médiu a počet nově diferenciovaných prýtků na různých médiích příliš nelišil. Při druhém pozorování explantátů pak byly stimulační účinky na růst prýtků pozorovány na médiu s CEP, BAP a MT naopak stimulovaly tvorbu nově diferenciovaných prýtků. Nejmenší prýty se diferenciovaly na médiu s MT a inhibiční účinky na růst prýtků přetrvaly po celou dobu kultivace. Jako optimální cytokinin se při pozorování růstu prýtků jevil CEP, na médiu s tímto cytokininem byly pozorovány nejvyšší prýty. Jedním z hlavních účinků cytokininů je redukce dlouhivého růstu stonků. Z naměřených výsledků tedy můžeme vyčíst, že nejvíce přidané regulátory působily na růst prýtků na kulturách kultivovaných na médiu s MT. V průběhu celé kultivace byly pozorovány výrazné stimulační účinky BAP a MT na tvorbu nových prýtků, naopak nejméně prýtků se tvořilo na kontrolním médiu. Dalším z účinků, které cytokininy při kultivacích vykazují je stimulace větvení a odnožování rostlin. Z výsledků měření tedy můžeme konstatovat, že tento účinek se nejvýrazněji projevila na médiu s BAP a MT s nejvyšším počtem nově diferenciovaných prýtků.

4.1.4. Výsledky měření velikosti kalusu



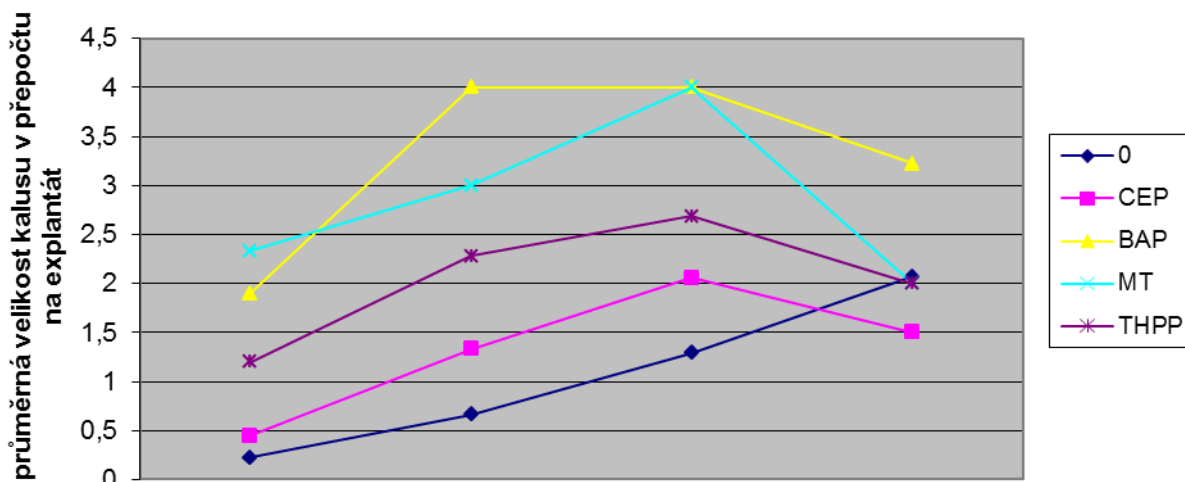
Graf 7: Celkový průměr velikosti kalusu explantátů za celou dobu kultivace

Po prvních 21 dnech kultivace se největší kalusy vyvinuly u kultur na médiu s MT a BAP. Téměř žádné kalusy však nebyly zaznamenány u kultur na kontrolním médiu.

Po 42 dnech kultivace byly pozorovány výrazné stimulační účinky BAP na tvorbu kalusu. Inhibice tvorby kalusu byla opět výrazná u kultur na kontrolním médiu.

Při pozorování po 63 dnech kultivace se opakovaly výsledky z předchozích měření.

Po 77 dnech kultivace došlo ke stimulaci růstu kalusu na kontrolním médiu a naopak k mírné inhibici růstu kalusu na médiu s MT. Na ostatních médiích se vytvořil kalus podle předchozích výsledků, kalusy kultur však byly menší než kalusy, které byly pozorovány při předchozích měřeních.

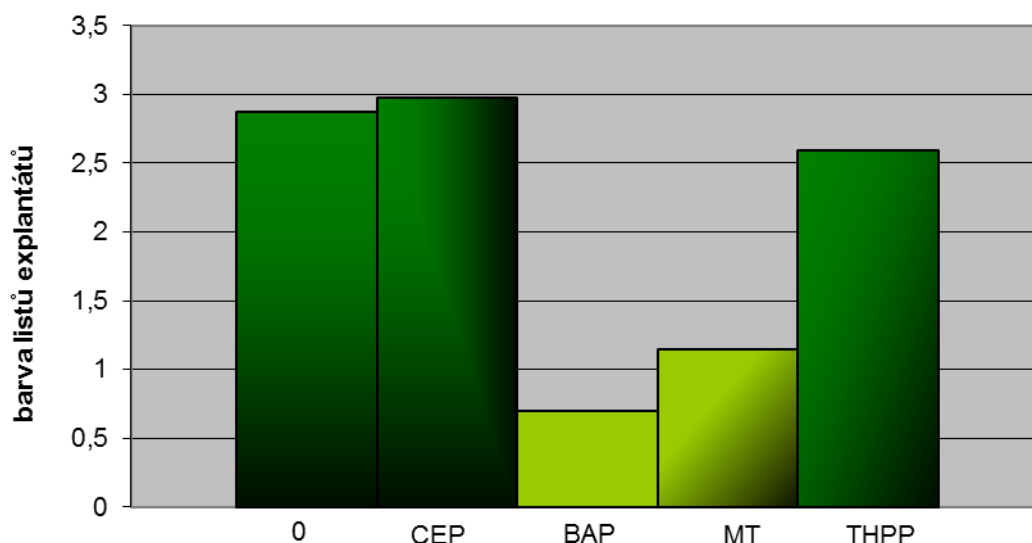


Graf 8: Velikost kalusu v průběhu kultivace během 77 kultivačních dnů

Během kultivace měl největší stimulační účinky na tvorbu kalusu BAP. Velké kalusy byly pozorovány také u kultur na médiu s MT. Velké kalusy pozorované u kultur na BAP a MT byly nahnědlé a obklopovaly všechny diferenciované prýty. Tyto kalusy byly velmi měkké při okrajích a při přenosu na nové živné médium měly tendenci se rozpadat. CEP a THPP také podporovaly tvorbu kalusu, ale s mnohem menší intenzitou. Kalusy byly méně četné a tvrdé. Na kontrolním médiu se téměř žádné kalusy netvořily. Kalus, který se vytvářel na bázi, mohl způsobit odlamování nově diferenciovaných kořínků nebo nedostatek chlorofylu a jiných látek v rostlině.

4.1.5. Výsledky měření barvy listů

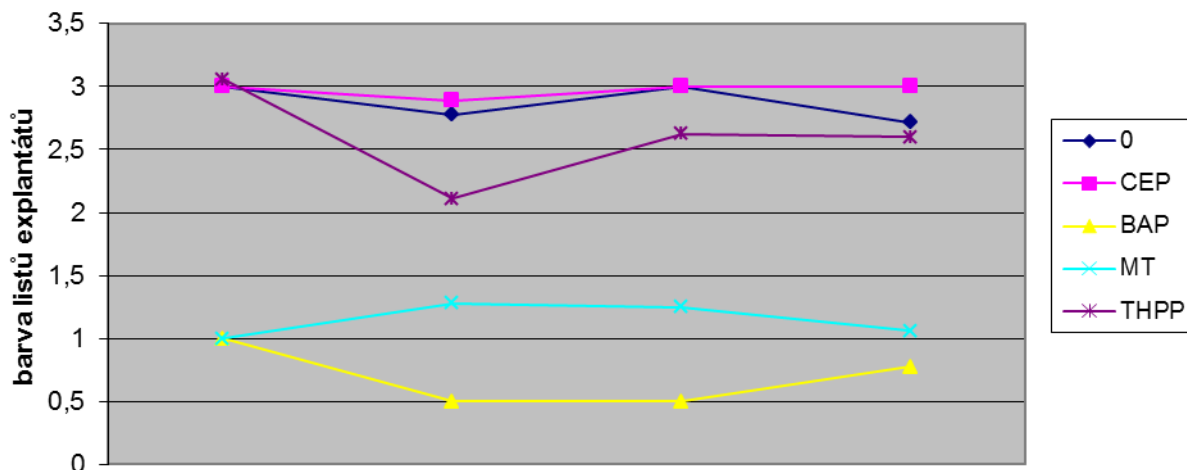
Legenda: čísla v grafu reprezentují sytost barvy listů



Graf 9: Celkový průměr barvy listů explantátů za celou dobu kultivace

Graf zaznamenává barvu listů explantátů z výsledků pozorování po celou dobu kultivace. Zabarvení listů vypovídá o množství chlorofylu, které listy obsahují a tím i o fotosyntetické aktivitě rostliny. Na kontrolním médiu a médiu s CEP se barva listů explantátů nezměnila po celou dobu kultivace a zabarvení zůstalo sytě zelené, listy tedy obsahovaly poměrně velké množství chlorofylu. Explantáty kultivované na médiích a BAP a MT vykazovaly při pozorování vyblednutí listů a listy měly velmi světle zelenou až bílou barvu. To svědčí o nedostatku chlorofylu v listech, který mohl být způsobený indukci tvorby velkých kalusů na médiích s BAP a MT. Kalusy vytvořené na bázi prýtků totiž mohou zabraňovat správné výživě rostliny. Na médiích s BAP a MT byly také pozorovány určité deformace listů explantátů. Listy byly velmi malé, dlouze protáhlé, bílé barvy s tmavě zelenými špičkami nebo okraji listů a jejich okraje byly více vykrojené.

Legenda: čím vyšší číslo v grafu, tím sytější zelená barva listů



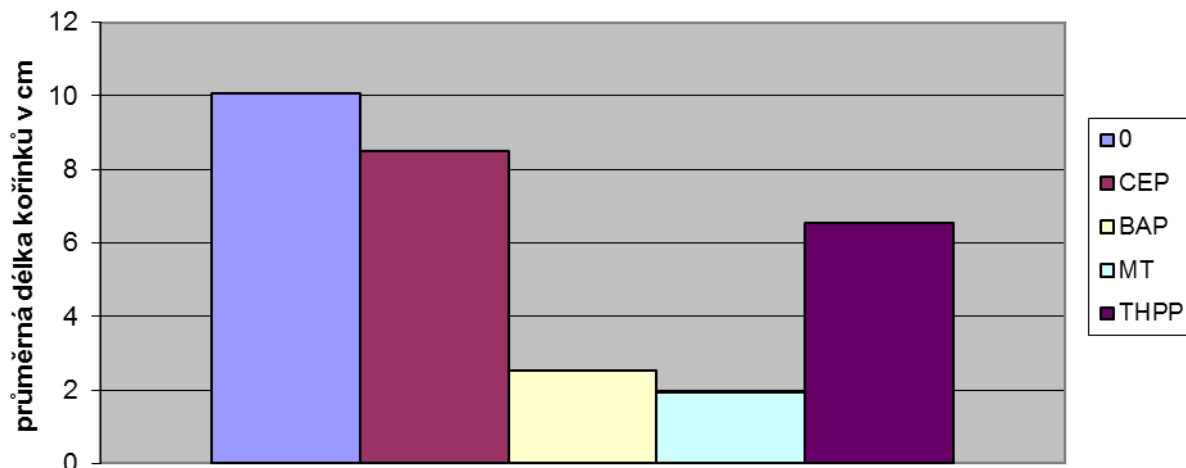
Graf 10: Barva listů v průběhu kultivace během 77 kultivačních dnů

Od začátku kultivace listy kultur kultivovaných na médiu s BAP a MT reagovaly na cytokininy výrazným vyblednutím a v pozdějším stadiu kultivace i deformací tvaru některých listů. U kultur na kontrolním médiu a médiu s CEP byly pozorovány sytě zelené listy normálního tvaru po celou dobu kultivace, zatímco barva listů kultur na médiu s THPP se při druhém pozorování jevila výrazně bledší. Po přepasážíování na nové živné médium už však listy explantátů nabyly zpět sytě zelenou barvu.

4.1.6. Výsledky měření průměrné délky kořínků po přepasážíování na médium prosté cytokininů

| DRUH MÉDIA | PRŮMĚRNÝ POČET KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT | PRŮMĚRNÁ DÉLKA KOŘÍNKŮ V PŘEPOČTU NA EXPLANTÁT |
|------------|--|--|
| 0 | 2,0 | 10,10 cm |
| CEP | 1,75 | 8,50 cm |
| BAP | 0,15 | 2,53 cm |
| MT | 0,34 | 1,94 cm |
| THPP | 0,75 | 6,54 cm |

Tabulka 13: Průměrná délka a počet kořínků po přepasážíování na médium prosté cytokininů



Graf 12: Průměrná délka kořínků explantátů přepasážívaných na médium prosté cytokininů

Dne 30. 11. 2012 byly kultury moruše přepasážívány na média prostá cytokininů za účelem pozorování schopnosti iniciovat tvorbu kořenů. Kořeny se diferenciovaly ve všech kultivačních nádobách. Nejdelší průměrné kořínky se diferenciovaly na explantátech, které byly na kontrolním médiu, nejkratší na explantátech dříve kultivovaných na médiu s MT. I přesto, že průměrně byly kořínky diferenciované na explantátech dříve kultivovaných na médiu s MT nejkratší, byl jich naměřen největší počet. Vzhledem k vysokému počtu explantátů se však po převedení na průměrný počet kořínků jeví toto číslo velmi malé. U explantátů dříve kultivovaných na médiích s BAP a MT se sice diferenciovaly krátké kořínky, rozdíl mezi ostatními médii se však umocnil tím, že na těchto médiích vzniklo velké množství prýtků bez kořínků a výsledky byly opět přepočítány na průměrné hodnoty. Ze získaných výsledků se dá usuzovat, že v explantátech moruše stále zůstaly zvýšené hladiny cytokininů, i když byly kultury přepasážívány na médium prosté cytokininů. Výsledky totiž odpovídají předchozím měřením provedeným při kultivaci s regulátory růstu.

4.1.7. Fotodokumentace pozorování provedeného po 21 dnech kultivace



Obr. 16: Explantát na kontrolním médiu
(vlastní zdroj)



Obr. 17: Explantát na médiu s CEP
(vlastní zdroj)



Obr. 18: Explantát na médiu s BAP
(vlastní zdroj)



Obr. 19: Explantát na médiu s MT
(vlastní zdroj)



Obr. 20: Explantát na médiu s THPP
(vlastní zdroj)

Na fotografiích jsou kultury moruše černé na médiích s různými cytokininy. Fotodokumentace byla pořízena při pozorování 5. 10. 2012. Můžeme si všimnout světlého zbarvení listů a velkých kalusů na médiích s BAP a MT (obr. 18 a 19).

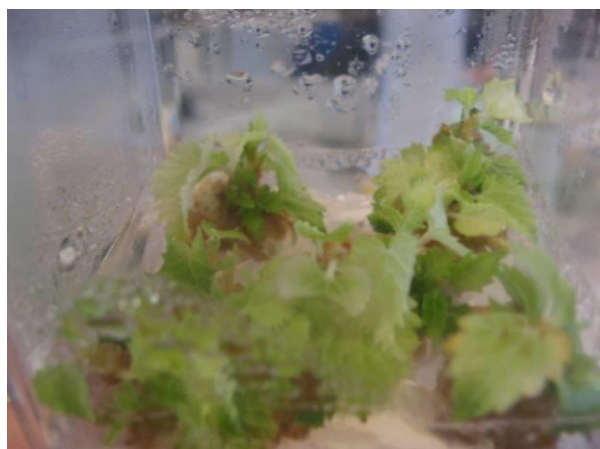
4.1.8. Fotodokumentace pozorování provedeného po 42 dnech kultivace



Obr. 21: Explantát na kontrolním médiu
(vlastní zdroj)



Obr. 22: Explantát na médiu s CEP
(vlastní zdroj)



Obr. 23: Explantát na médiu s BAP
(vlastní zdroj)



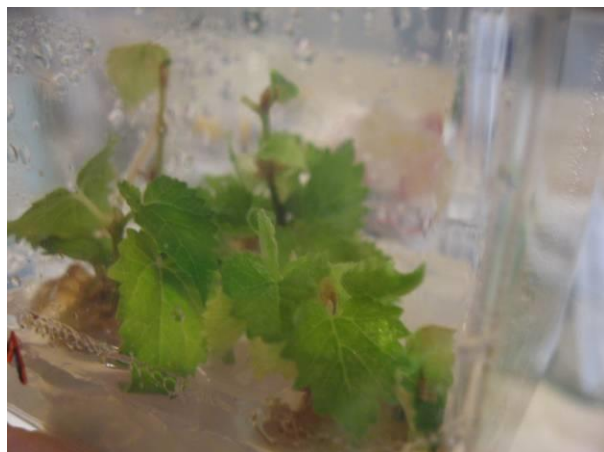
Obr. 24: Explantát na médiu s MT
(vlastní zdroj)



Obr. 25: Explantát na médiu s THPP (vlastní zdroj)

Explantáty moruše na fotografiích byly vyfotografovány 26. 10. 2012. Zajímavostí je náhlé vyblednutí barvy listů kultur na médiu s THPP (obr. 25).

4.1.9. Fotodokumentace pozorování provedeného po 63 dnech kultivace



Obr. 26: Explantát na kontrolním médiu (vlastní zdroj)



Obr. 27: Explantát na médiu s CEP (vlastní zdroj)



Obr. 28: Explantát na médiu s BAP (vlastní zdroj)



Obr. 29: Explantát na médiu s MT (vlastní zdroj)



Obr. 30: Explantát na médiu s THPP (vlastní zdroj)

Kultury byly vyfotografovány 16. 11. 2012. Na fotografiích jsou viditelné velké kalusy explantátů na médiích s BAP a MT (obr. 28 a 29), a také zvětšené kalusy explantátů na kontrolním médiu (obr. 26).

4.1.10. Fotodokumentace pozorování provedeného po 77 dnech kultivace



Obr. 31: Explantát na kontrolním médiu
(vlastní zdroj)



Obr. 32: Explantát na médiu s CEP
(vlastní zdroj)



Obr. 33: Explantát na médiu s BAP
(vlastní zdroj)



Obr. 34: Explantát na médiu s MT
(vlastní zdroj)



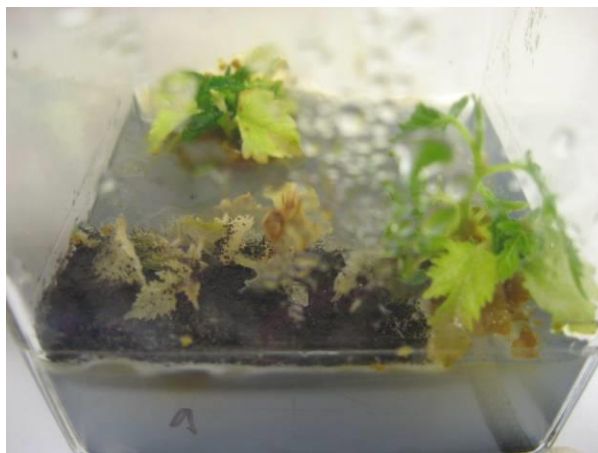
Obr. 35: Explantát na médiu s THPP (vlastní zdroj)

Fotografie explantátů byly pořízeny 30. 11. 2012. Můžeme si na nich všimnout kořínků diferenciovaných na médiu s CEP a na médiu s THPP (obr. 32 a 35) a tvarové deformace listů explantátů na médiu s BAP (obr. 33).

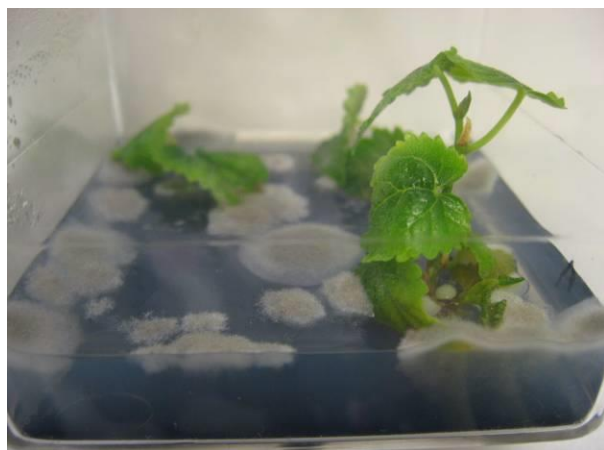
4.1.11. Fotodokumentace kontaminovaných explantátů



Obr. 36: Kontaminované explantáty
(vlastní zdroj)



Obr. 37: Kontaminované explantáty
(vlastní zdroj)



Obr. 38: Kontaminované explantáty
(vlastní zdroj)



Obr. 39: Kontaminované explantáty
(vlastní zdroj)

Na fotografiích jsou vidět kontaminace kultur, které proběhly během kultivace. Kontaminace se liší tvarem, barvou i velikostí. Na obr. 36 a 37 můžeme vidět, že byly kontaminovány pouze některé explantáty a to plísní, která vytvářela spóry v podobě malých černých kuliček. Kontaminace na obr. 38 naopak nepostihla explantáty, ale rozšířila se pouze na médiu. V kultivační nádobě na obr. 39 kontaminace postihla celou plochu nádoby a ve formě malých černých kuliček způsobila zežloutnutí a opadání všech listů. Kontaminace byla způsobena kolísáním teploty v kultivační místnosti, které vedlo k zarosení kultivačních nádob a následnému proniknutí spór.

5. Diskuse

V této práci byly srovnávány účinky exogenních cytokininů na *in vitro* kultury moruše černé. Testovány byly 4 druhy cytokininů, včetně benzylaminopurinu, meta-topolinu a jejich derivátů. Pozorované výsledky byly průběžně zapisovány a ze sesbíraných dat byly vytvořeny grafy a tabulky, znázorňující vývoj kořenového systému, množství chlorofylu v listech (schopnost fotosyntetického procesu), velikost kalusu na bázi explantátu a proliferaci prýtků. Pozorována byla také schopnost explantátů zakořenit po přepasážování na médium prosté cytokininů.

Pozornost byla soustředěna na účinky cytokininu se zkratkou CEP, což je nově vyvinutý derivát meta-topolinu, od kterého se očekávají obdobné účinky jako u benzylaminopurinu, neměl by však inhibovat vývoj kořenového systému.

5.1. Délka a počet kořínků

Nejdůležitějším pozorovaným parametrem byl vývoj kořenového systému explantátů a schopnost zakořenit. Explantáty na kontrolním médiu bez cytokininů prokázaly schopnost snadno a rychle zakořenit dlouhými, četnými kořeny s kořenovým vlášením. Ještě lepší výsledky byly pozorovány u kultivačních nádob s přidaným CEP, kde explantáty podobně kořenily četnými, dlouhými kořeny s kořenovým vlášením a také byly v těchto kultivačních nádobách naměřeny nejdelší a nejvíce četné kořeny. Účinky CEPu tedy ukazují na iniciaci a stimulaci vývoje kořenového systému explantátů. BAP a MT úplně inhibovaly vývoj a růst kořenů po celou dobu kultivace. Je možné, že to bylo způsobeno současnou indukcí tvorby kalusu na bázi explantátů, který může zapříčinit odlamování kořínků. Na kultivačním médiu s THPP se tvořily dlouhé, ale málo četné kořeny bez kořenového vlášení. Při přepočtu na průměrnou délku na explantát tedy byla výsledná průměrná délka kořenů kratší než na médiu s CEP nebo kontrolním médiu. Aremu *et al.* (2012) uvádějí, že při koncentraci 10 μ M THPP byl zaznamenán nejnižší inhibiční efekt na pozdější tvorbu kořenů. Tyto výsledky mohou být srovnatelné s dosaženými výsledky práce, jelikož výraznější vývoj kořenového systému než u THPP probíhal pouze na kontrolním médiu a médiu s CEP, se kterými tým pana Aremu nepracoval. Podlešáková *et al.* (2012) ve své práci zmiňují, že nesubstituované aromatické cytokininy přítomné v kultivačním médiu způsobují ztlustění a zkrácení primárních kořenů. Zároveň inhibují jejich větvení a dokonce vykazují některé negativní vlivy i při tak nízkých koncentracích jako je 10nM. Nové analogy aromatických cytokininů patřící k topolinům substituovaným na N9-atomu adeninu tetrahydropyranolovou nebo 4-chlorobutylovou skupinou byly připraveny a testovány standardizovaným cytokininovým biotestem. Ty, které vykazovaly aktivity srovnatelné s N6-benzylaminopurinem byly dále testovány na rostlinách. Tetrahydropyranolová substituce na N9-pozici způsobuje urychlení transportu nativních cytokininů. Spolu s methoxy-substitucí zabraňuje hromadění neaktivních glukozidových forem v kořenech, umožňuje postupné uvolňování aktivních bází a má významný efekt na distribuci a množství endogenních izoprenoidních cytokininů v různých rostlinných pletivech. Využití nových aromatických cytokininových derivátů může výrazně zlepšit očekávaný efekt cytokininů při mikropropagačních technikách v budoucnosti [24].

5.2. Výška a počet prýtků

Dalšími z pozorovaných parametrů byla výška a počet prýtků explantátů. Tento parametr ukazuje na schopnost stimulace větvení a odnožování rostlin a také potlačení apikální dominance

u explantátů. Aremu *et al.* (2012) uvádějí, že cytokininy obecně zvyšovaly produkci prýtků. Ve srovnání s BAP bylo při využití topolinu získáno více prýtků při nižší koncentraci cytokininu. V mé práci byly sice užity pouze cytokininy o jedné koncentraci (10 μ M), výsledky práce však můžeme srovnat s výsledky týmu pana Aremu, na médiu s MT se totiž tvořilo nejvíce prýtků. Aremu *et al.* (2012) dále uvádějí, že na rozdíl od jiných cytokininů, které působily jen ve vyšších koncentracích bylo získáno optimální množství prýtků na explantátu u nejnižších koncentrací THPP (tedy právě na 10 μ M). Výsledky práce ukazují, že na médiu s THPP se nediferenciovalo nejvíce prýtků, počet nově vzniklých prýtků však byl uspokojivý. Tým pana Aremu také zjistil, že nejvýraznější stimulační účinky na tvorbu nových prýtků měl BAP a MT. To souhlasí s výsledky mé práce, bylo pozorováno, že nejvíce prýtků se tvořilo na médiu s BAP a MT. K tomuto výsledku došli i Amoo a van Staden (2013), kteří uvádí, že BAP a MT měly při pozorování srovnatelné účinky na proliferaci prýtků. Nejméně prýtků se diferenciovalo na kontrolním médiu bez růstových regulátorů. Při pozorování výšky prýtků bylo zjištěno, že růst prýtků stimuloval CEP, zatímco MT růst prýtků výrazně inhiboval. Zatloukalová (2012) zmiňuje, že na médiu prostém cytokininů se diferenciovaly vysoké prýtky. Při mém pozorování explantátů byly také zaznamenány poměrně vysoké prýtky na kontrolním médiu bez cytokininů.

5.3. Velikost kalusu

Tvorbu kalusu, který může způsobovat odlamování kořínek nebo nesprávnou výživu explantátu, stimuloval BAP a MT. Minimální kalusy se tvořily na bázi explantátů na kontrolním médiu. Kalus je spíše negativní jev. Způsobuje nežádoucí účinky inhibicí tvorby kořenového systému a kvůli nesprávné výživě explantátu může dojít k snížené tvorbě fotosyntetických barviv.

5.4. Barva listů (hladina fotosyntetických barviv)

Barva listů explantátů svědčí o množství fotosyntetických barviv obsažených v listech. Na médiích s BAP a MT měly listy velmi světle zelenou až bílou barvu, což prokazuje nízkou hladinu chlorofylu. To může být způsobeno současnou stimulací tvorby velkých kalusů, zapříčiňujících nedostatečný přísun živin. Aremu *et al.* (2012) konstatují, že kontrolní rostliny měly největší obsah fotosyntetických barviv a z cytokininů byla největší produkce barviv u THPP. To souhlasí s dosaženými výsledky práce, explantáty na kontrolním médiu a na médiu s CEP měly po celou dobu kultivace tmavě zelené listy, prokazující dostatečné množství fotosyntetických barviv. THPP produkci fotosyntetických barviv také stimuloval, pouze při jednom pozorování bylo zjištěno vyblednutí barvy listů, což mohlo být způsobeno dlouhodobější kultivací na stejném médiu bez přepasáží.

5.5. Délka a počet kořínek po přepasáží

Po ukončení kultivace byly explantáty přepasáží na nové kultivační médium prosté cytokininů. Ze získaných výsledků se dá usuzovat, že v explantátech moruše stále zůstaly zvýšené hladiny cytokininů, i když byly kultury přepasáží. Výsledky měření průměrné délky a počtu kořínek totiž odpovídají předchozím měřením provedeným při kultivaci s regulátory růstu. Kořeny se diferenciovaly ve všech kultivačních nádobách, nejdelší na explantátech dříve kultivovaných na kontrolním médiu a nejkratší u explantátů dříve kultivovaných na médiu s MT.

6. Závěr

Tato práce je zaměřena na studium účinků různých druhů cytokininů na *in vitro* kulturu moruše černé. Hlavním cílem bylo v pěti určených parametrech sledovat účinky čtyř druhů cytokininů, benzylaminopurinu, meta-topolinu a jejich dvou derivátů, na morfologii explantátů moruše.

Při pozorování schopnosti explantátů zakořenit byl jako optimální růstový regulátor vyhodnocený CEP, derivát meta-topolinu s nasycenou vazbou na N9. Na médiu s CEP se tvořilo nejvíce kořínků a tvorba kořenů byla vyrovnaná u všech explantátů v kultivační nádobě. Stimulační účinky na tvorbu a vývoj kořenového systému prokázal i THPP. Na médiu s THPP se diferenciovaly velmi dlouhé kořínky, které však byly málo četné. Proliferaci prýtků nejvíce stimuloval CEP, na médiu s CEP se tvořily nejvyšší prýty. Nejvíce četné prýty však byly pozorovány na médiu s MT. Tyto prýty vyrůstaly z velkého kalusu na bázi a byly velmi malé. Největší kalusy se tvořily na bázi explantátů na médiích s BAP a MT. Kalusy však byly vnímány spíše jako negativní jev, mohou totiž zabraňovat správné výživě explantátů a tím významně ovlivnit hladinu fotosyntetických barviv v listech moruší. Nejvíce těchto enzymů obsahovaly listy explantátů kultivovaných na kontrolním médiu a médiu s CEP. Nejméně fotosyntetických enzymů obsahovaly listy explantátů, na které působily BAP a MT. Tyto listy byly velmi malé, světle zelené až bílé a na některých byly pozorovány neobvyklé tvarové deformace.

Po zvážení výsledků se jako optimální cytokinin pro kultivaci jeví CEP, který stimuloval růst nejdelších a nejvíce četných kořínků, pozitivně ovlivnil proliferaci prýtků a neindukoval tvorbu kalusu, takže listy explantátů kultivovaných na CEP obsahovaly nejvyšší hladiny fotosyntetických barviv. Jako nejméně vhodný se jevil BAP, přestože se v praxi využívá nejvíce.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že si deriváty MT zasluhují právem pozornost šlechtitelské i pěstitelské praxe a mohou najít široké uplatnění zejména při mikropropagaci zatím méně rozšířených ovocných dřevin, jako je moruše černá, kde běžně používaný BAP může způsobovat problémy s následným růstem a zakořeněním.

7. Seznam použité literatury

- [1] MALEČKOVÁ, Hana. Příprava a biologická aktivita 2,6 - disubstituovaných derivátů adenosinu. Olomouc, 2012. Diplomová práce. Univerzita Palackého.
- [2] SALAJ, Terézia a Alžběta BLEHOVÁ. *In vitro kultury vyšších rostlin*. 2006. Přírodovědecká fakulta Univerzity Komenského
- [3] KOVÁČ, Jaroslav. *Explantátové kultury rostlin*. 1992. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně
- [4] DUBOVÁ, Jaroslava. *Mikropropagace: Množení in vitro*. 2011. Univerzita Masarykova
- [5] RÓTH, Matěj. *Metody kultivace rostlinných explantátů v tekutých médiích*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Masarykova
- [6] Micropropagation of Cavendish Banana in Taiwan. Food & Fertilizer Technology Center [online]. 2003 [cit. 2013-02-13]. Dostupné z: <http://fftc.imita.org/library.php?func=view&id=20110809105140>
- [7] Masarykova MATONHOVÁ, Martina. *Hormonální regulace DE NOVO: Organogeneze rostlin*. Brno, 2010. Univerzita Masarykova
- [8] DUBOVÁ, Jaroslava. *Fytormony a růstové regulátory: Auxiny, gibereliny a cytokininy*. 2012. Univerzita
- [9] Cytokininy. BioLib.cz [online]. 2009 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/id3713/>
- [10] DOSPIVOVÁ, Dana. Termodynamické studium interakcí fyziologicky významných derivátů purinu. Brno, 2009. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
- [11] 6-Benzylaminopurine BioChemica. AppliChem [online]. 2005 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: <http://www.applichem.com/en/shop/product-detail/as/6-benzylaminopurin-ibiochemical/>
- [12] 6-Benzylaminopurine. Wikipedia.org [online]. 2006 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/6-Benzylaminopurine>
- [13] MALEČKOVÁ, Hana. Příprava a biologická aktivita 2,6 - disubstituovaných derivátů adenosinu. Olomouc, 2012. Diplomová práce. Univerzita Palackého.
- [14] The effect of meta-topolin on protein profile in radish cotyledons. Journal of Cell and Molecular Biology 2 [online]. 2003 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/2-1/The_effect2.pdf
- [15] Meta-TOPOLIN (mT). ChemicalBook [online]. 2010 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB42471754.htm
- [16] PROCHÁZKA, Stanislav a Jiří ŠEBÁNEK. *Regulátory rostlinného růstu*. Praha: Academia, 1997. ISBN 80-200-0597-8
- [17] PROTOCOL. TITERING OF BACTERIAL VIRUSES [online]. 2009 [cit. 2013-02-17]. Dostupné z: http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/labs/microbiology/Phage/index_phage.html
- [18] Morušovník černý, bílý, červený, obr mezi ovocnými stromy. IReceptář.cz [online]. 2009 [cit. 2013-02-17]. Dostupné z: <http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/morusovnik-cerny-bily-cerveny-obr-mezi-ovocnymi-stromy/>
- [19] Morus nigra: Moruše černá. *Safro Milan Havlis* [online]. 2010 [cit. 2013-02-14]. Dostupné z: <http://www.havlis.cz/karta.php?kytkaid=1111>
- [20] Morušovník černý, bílý, červený, obr mezi ovocnými stromy. IReceptář.cz [online]. 2009 [cit. 2013-02-14]. Dostupné z: <http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/morusovnik-cerny-bily-cerveny-obr-mezi-ovocnymi-stromy/>

- [21] Laminární box. *Wikipedie.cz* [online]. 2012 [cit. 2013-02-14]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Lamin%C3%A1rn%C3%AD_box
- [22] Callus (cell biology). *Wikipedia.org* [online]. 2011 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Callus_%28cell_biology%29
- [23] Izolace a kultivace. Laboratoř ekologie fytoplanktonu [online]. 2010 [cit. 2013-02-17]. Dostupné z: <http://www.fytoplankton.cz/sbirka-sinic/show.php?show=8>
- [24] PODLEŠÁKOVÁ, Et al. Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. Olomouc, 2012. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22723989>. Diplomová práce. Univerzita Palackého.