



Metodické listy OPVK

Využití moderních *in vitro* biotechnologií v ovocnářství

19.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



ZALOŽENÍ IN VITRO KULTURY

Založení *in vitro* kultury - sterilizace výchozího explantátu

Úvod

Ovocné druhy lze kromě přirozených polních podmínek pěstovat také v umělých laboratorních podmínkách. Jedná se zejména o kultivaci (množení) 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). Kromě skleněných nádob se používají také nádoby z průhledných plastů.

Kromě názvu *in vitro* se používá také název kultury rostlinných explantátů. Na rozdíl od polních podmínek umožňují kultury *in vitro* kromě pěstování celistvých rostlin i pěstování jejich oddělených částí – explantátů. 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 je v tělních buňkách obsažena celá genetická informace pro vývoj kompletního organismu. Za vhodně nastavených a kontrolovaných *in vitro* podmínek lze vývojové procesy u explantátů zakončit kompletní regenerací celé rostliny. Na rostliny ovocných druhů, které jsou pěstovány ve sterilním prostředí, nepůsobí, s výjimkou virů a fytoplazem, žádné jiné organizmy (především houby a bakterie).

Celoroční množení pomocí moderních biotechnologických metod v laboratorních podmínkách ve formě *in vitro* kultur rostoucích na umělých živných médiích představuje velkou perspektivu pro zefektivnění produkce nových rostlin. Ve sterilním prostředí *in vitro* kultur je minimalizováno riziko infekce houbovými nebo bakteriálními chorobami a je vyloučeno napadení živočišnými škůdci. *In vitro* kultury je možno pěstovat a množit v průběhu celého roku bez ohledu na roční období. V *in vitro* kulturách lze během jednoho měsíce dosáhnout u některých ovocných druhů a odrůd více než čtyřnásobného zmnožení výchozího rostlinného explantátu. V průběhu jednoho roku tak lze z jednoho výchozího vrcholu získat stovky až tisíce nových rostlin na ploše několika metrů čtverečních, což je ekonomicky efektivní.

Nároky na technické a materiální vybavení

Přístrojové zabezpečení

Chemická laboratoř a příprava chemikálií: Chladnička (+4 °C), mraznička (-20 °C), pH-metr, laboratorní váhy, sušička (160 °C), mikrovlnná trouba, magnetické míchadlo pro míchání zásobních roztoků, hřídelové míchadlo s ohřevem pro míchání pěstebních agarových médií.

Laboratoř vybavená pro práci s *in vitro* kulturami: Autokláv (parní tlakový sterilizátor) pro sterilizaci kultivačních médií, horkovzdušná sušárna pro sterilizaci chemického skla, flowbox – box pro sterilní pasážování *in vitro* kultur, kultivační místnost nebo kultivační box s řízenou teplotou a osvětlením.

Materiál a chemikálie: Chemikálie pro přípravu kultivačních médií, filtrační papír, papírové ručníky, laboratorní sklo (Erlenmeyerovy baňky, sklenice s uzavíratelným víčkem, zkumavky, kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, Petriho misky apod.), antibakteriální mikrofiltry, stříčky, míchadla, permanentní popisovač na sklo a na plast, sterilizovatelný skalpel, pinzety, pipety.

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.

Dále je doporučováno zařízení pro přípravu demineralizované vody reverzní osmózou. V případě reverzní osmózy se jedná o působení vyššího tlaku, než je tlak osmotický na koncentrovanější roztok, tak aby přes filtrační membránu přecházela čistá voda opačným směrem z koncentrovanějšího roztoku, zatímco rozpuštěné látky jsou svedeny do odpadu. Demineralizovaná voda se dá rovněž vyrobit elektrodestilací. Tato vyčištěná voda slouží pro přípravu kultivačních, agarem zpevněných,



půd. Pro růst *in vitro* kultur je nutná kultivační místnost s řízenou teplotou a osvětlením. Subkultivace a následný přenos *in vitro* rostlin na čerstvá média je nutno provádět ve sterilním prostředí „flowboxu“ s proudícím filtrovaným vzduchem. Flowbox umožňuje zachovat materiál sterilní při manipulaci (pasážování) mimo kultivační nádobu.



Horkovzdušná sušárna a magnetické míchadlo



Flow boxy pro práci v aseptickém prostředí

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

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.



Odměrné baňky s připravenými zásobními roztoky, antibakteriální mikrofiltry



Erlenmeyerovy baňky a sklenice uzavíratelné transparentním víčkem

1) Rostlinný materiál

Pro uchování odrůdové stability doporučujeme zakládat *in vitro* kultury z vegetačních vrcholů zpravidla větších než 0,2 mm. V průběhu jednotlivých měsíčních kultivačních cyklů pak vedeme tyto kultury na pevném agarovém médiu ve formě aktivně rostoucích mnohonásobných výhonů s dobře diferencovaným růstovým vrcholem. Pro založení *in vitro* kultury růstových vrcholů nejsou vhodné květní pupeny, protože obsahují převážně základ květu s několika listy a nikoliv základ letorostu s 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.

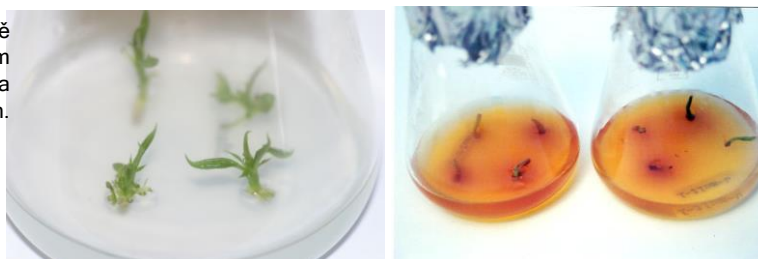
Při založení kultury je možno využít výhony odebrané v zimních měsících nebo v předjaří v době vegetačního klidu (leden až březen) přímo z polních podmínek z rostlin ověřených z hlediska odrůdové pravosti. Takto odebrané dormantní výhony se následně nechají narašit v laboratorních podmínkách při pokojové teplotě. Kromě období vegetačního klidu lze odebírat a vypreparovat aktivně rostoucí růstové vrcholy v případě potřeby i přímo z polních podmínek nejlépe na počátku vegetace 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 flowboxu 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 přídavkem smáčedla. Na základě našich výsledků doporučujeme z důvodu bezpečného použití pro středoškolská praktická cvičení chlornan sodný 0,5 % se sterilizační dobou jedna minuta. Tuto látku lze nalézt například v běžně dostupných komerčních činidlech určených pro dezinfekci v domácnostech. Při práci se všemi sterilizačními činidly je nutné dodržovat návod výrobce a to zejména z hlediska možné toxicity a rizika poškození zdraví. Jako smáčedlo lze použít Tween 20 nebo i několik kapek běžně užívaných komerčně vyráběných prostředků na mytí nádobí (Jar). Smáčedlo je důležité, protože snižuje jinak vysoké povrchové napětí čisté vody a umožňuje tak 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. Takto postižené *in vitro* rostliny je možno zachránit přenosem na čerstvé médium.

Všechny kontaminované kultury je nutno vyřadit a zlikvidovat. Kontaminace se projevují jako bílé, nebo barevné změny (zákaly, skvrny, povrchový film). Nekontaminované explantáty přeneseme po jednom měsíci 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, které je způsobeno nadprodukcí a následnou oxidací fenolických látek vytékajících z řezných ran na povrchu explantátu, je v *in vitro* kultuře nežádoucí. Oxidací vznikají fyto toxické 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.

Tabulka 1. Východní složky modifikované MS média chemikálie pro *in vitro* kultivaci

| Složka | mg · l ⁻¹ | Složka | mg · l ⁻¹ |
|--|----------------------|--|----------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1 650 | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,025 |
| KNO ₃ | 1 900 | Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 37,3 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 27,8 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | Thiamin | 0,1 |
| KI | 0,83 | Pyridoxin | 0,5 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,25 | Kyselina nikotinová | 0,5 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,025 | Glycin | 2 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 440 | Sacharóza | 30 000 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 370 | Myo-inositol | 100 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 22,3 | Agar | 7 000 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 8,6 | Kyselina askorbová | 4 |
| pH média | 5,8 | | |

INDUKCE DĚLENÍ BUNĚK

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. Cytokiny jsou přirozenou cestou vytvářeny v rostlině hlavně v oblasti vrcholů kořenů. Odtud jsou potom transportovány lýkem do nadzemní části rostliny. Cytokiny u

rostlin hrají důležitou roli v mnoha vývojových procesech. Podporují regeneraci a pomáhají kontrolovat vývoj organismu rostliny. 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 výhonů. Působením cytokininů dochází k potlačení apikální (vrcholové) dominance a k podpoře vývoje pupenů v úžlabí listových základů v aktivně rostoucí výhony. Je potřeba si uvědomit, že přítomnost cytokininů v kultivačním médiu zároveň inhibuje tvorbu kořenů. Nejčastěji používaným cytokininem pro množení rostlin z čeledi růžovitých je BAP (6-benzylaminopurin). Cytokininovou aktivitou se vyznačují také některé chemické látky odvozené od močoviny např. thidiazuron TDZ. Při použití cytokininu TDZ však stoupá riziko výskytu nežádoucích vývojových vad, jako je například vysoká tvorba kalusu (nediferencované hojivé pletivo) na spodní části explantátů nebo abnormálně ztlustlé výhony (foto 8).

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 výhony.

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.

V tabulce 2 je uveden příklad výsledku multiplikace u odrůd jabloně, hrušně a třešně.

Tabulka 2. Koeficienty množení jednotlivých genotypů hrušně, jabloně a třešně na médiu s různými koncentracemi cytokininů.

| Cytokinin (mg · l ⁻¹) | 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 ⁿ | 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 ⁿ | 1,5 ± 0,1 | 1,3 ± 0,1 |
| 4.0 | 2,6 ± 0,2 ^z | 8,1 ± 0,4 | 2,1 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 ⁿ | 2,1 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 |
| TDZ | | | | | | |
| 0,5 | 2,1 ± 0,1 ^{yz} | 2,4 ± 0,2 | 1,8 ± 0,1 ^{yz} | 2,0 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 |
| 1 | 4,5 ± 0,2 ^{yz} | 2,1 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 ^{yz} | 2,1 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0 | 1,2 ± 0,1 |

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

INDUKCE TVORBY KOŘENŮ POMOCÍ AUXINŮ

Auxiny, jako regulátory růstu, hrají v rostlinném organismu důležitou úlohu při řízení dělení, prodlužování a diferenciaci buněk. Auxiny v dostatečné koncentraci působí na rostlinné buňky jako spouštěcí mechanismus pro tvorbu primordií (zárodečných stádií) kořenů. Tato kořenová primordia



Kořenění třešně 'P-HL-A' v *in vitro* kultuře na MS médiu s přidavkem fytohormonu IBA (1 mg · l⁻¹).

se v podmínkách *in vitro* kultur diferencují z meristematičtých růstových center přibližně šestý den po vystavení rostlinného explantátu působení auxinu. Pro vyvolání tvorby kořenů jsou využívány zejména IBA (kyselina beta indolylmásečná), IAA (kyselina beta indolylactová) a NAA (kyselina alfa naftylactová). Vznik a formování kořenů je komplexní jev, který může být ovlivněn i dalšími chemickými látkami například fenoly nebo enzymy peroxidázami. Mezi jednotlivými odrůdami ovocných plodin existují významné rozdíly ve schopnosti zakořeňování výhonů.

Protože auxiny, patřící mezi termolabilní látky, mohou snadno podléhat znehodnocení použitím vysoké teploty v procesu zahřívání ve sterilizačním zařízení při dezinfekci média. Je proto doporučováno jejich dodatečné přidávání až do hotového vysterilizovaného média přes bakteriální mikrofiltry, které slouží k zachycení škodlivých mikroorganismů. 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.

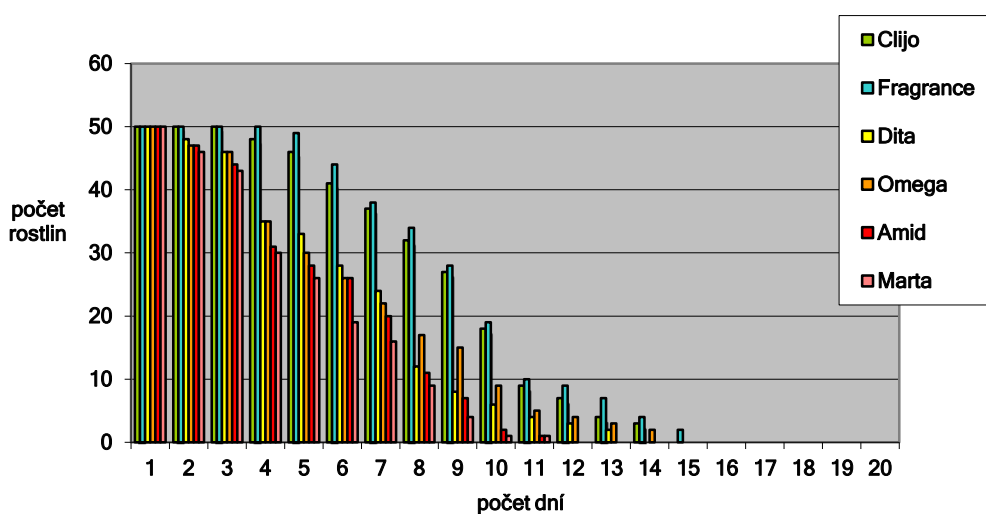
Po fázi kořenění jsou kořenicí rostliny ze sterilního prostředí *in vitro* kultur zpětně převedeny do běžných kultivačních podmínek do pěstebního substrátu ve skleníku nebo přímo do volné půdy.

Explantáty rostou ve fázi *in vitro* kultury v téměř vzduchotěsných kultivačních nádobách v podmínkách vysoké vzdušné vlhkosti (až 100 %), nízké intenzity osvětlení a přítomnosti z vnějšku uměle dodaných růstových regulátorů – fytohormonů. To má za následek formování rostlin se změněným fungováním orgánů. Z tohoto důvodu je proto nutné provádět aklimatizaci na běžné kultivační podmínky postupně a to buď s použitím průhledných plastových krytů nebo miniskleníků s regulovatelným odvětráváním. Tak lze pozvolna snižovat vzdušnou vlhkost v okolí převáděných rostlin až na běžnou vzdušnou vlhkost. Další možností je použití kultivačního boxu s možností regulace vlhkosti a osvětlení.

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 množení mnoha běžně se vyskytujících rostlinných virů. Dále vzhledem k nerovnoměrnému rozložení viru v rostlině a poklesu koncentrace směrem k růstovému vrcholu lze předpokládat, že většina virů není schopna napadat nově se tvořící vrcholové 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. Vysoká teplota přesahující 30 °C je 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 odrůd. 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 meristemů, 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.



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

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

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'. Střední teplotní odolnost vykazovaly odrůdy hrušně 'Dita' a 'Omega'.

Ozdravování pomocí chemoterapie

Jednou z účinných metod ozdravování rostlinného materiálu je aplikace chemických preparátů s virostatickými (protivirovými) účinky. Chemickou látku s virostatickými účinky lze přidat do používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí tzv. antibakteriálních mikrofiltrů po sterilizaci média. Tyto antibakteriální mikrofiltry odfiltrují částice kontaminujících mikroorganismů a propustí do média pouze účinnou látku. 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 chemickou látkou při ozdravování rostlinného materiálu je ribavirin. V našich pokusech se úspěšnost ozdravování chemoterapií významně lišila od 0 do 100 % v závislosti na odrůdě, 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⁻¹ 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⁻¹ ribavirinu. Naopak nejhorší výsledek a nulové ozdravení byl zaznamenán na médiu s nižší koncentrací ribavirinu 20 mg · l⁻¹ 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⁻¹ ribavirinu a následně na médiu s vyšší koncentrací ribavirinu 100 mg · l⁻¹. 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.

In vitro kultura jabloně 'Clijo' vitálně prorůstající v průběhu chemoterapie na MS médiu s ribavirinem v koncentraci 20 mg · l⁻¹.



In vitro kultura jabloně 'Clijo' - příznaky fytotoxicity na MS médiu s ribavirinem v koncentraci 80 mg · l⁻¹.

Systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu je založen na směrnici 2008/90 ES ze dne 29. září 2008 o uvádění na trh rozmnožovacího materiálu ovocných rostlin a ovocných rostlin určených k produkci ovoce. Touto směrnicí je potřeba se řídit při produkci školkařského materiálu ovocných dřevin. Součástí směrnice je i příloha „Seznam specifických škodlivých organismů a chorob snižujících jakost“, kde jsou vyjmenovány i viry a virům podobné organismy, od kterých je v případě infekce potřeba ozdravit výchozí množitelský rostlinný materiál.

Rejstřík odborných pojmů

Agar – je přírodní polysacharid s vysokou gelující schopností. Vyrábí se z vybraných druhů mořských řas. Používá se jako jedna ze základních složek živných médií pro kultivaci mikroorganismů a rostlin.

Aseptický – sterilní, bez přítomnosti mikroorganismů.

Explantát – izolovaná část rostlinného těla – orgány (stonek, listy, kořeny), pletiva nebo buňky pěstované ve sterilních podmínkách *in vitro* kultury.

Flowbox – někdy také laminární box je laboratorní zařízení. Flowbox filtruje vzduch od mikroorganismů pomocí vysoce účinných filtrů. Pracovníci tak mají možnost pracovat ve sterilním prostředí s minimálním rizikem kontaminace zpracovávaného *in vitro* materiálu.

Fytotoxicita – negativní projev působení chemické látky na rostlinu projevující se snížením intenzity růstu, při silném projevu může dojít až k nekrotizaci a odumření celé rostliny.



Pasážování – manipulace s rostlinným *in vitro* materiálem mimo kultivační nádobu ve sterilním prostředí flowboxu.

Primordium – biologický útvar-zárodečné stadium, ze kterého se následně formuje orgán

Reverzní osmóza – působení vyššího tlaku, než je tlak osmotický na koncentrovanější roztok, tak aby přes filtrační membránu přecházela čistá voda opačným směrem z koncentrovanějšího roztoku do připojeného zásobníku.

Ribavirin – nejpoužívanější chemická látka s protivirovými účinky.

Smáčedlo – snižuje jinak vysoké povrchové napětí čisté vody a umožňuje tak při sterilizaci *in vitro* snazší proniknutí sterilizačního činidla do kontaminované části výchozího explantátu.

Subkultivace – časová jednotka – část kultivačního cyklu *in vitro* kultury, na jejímž konci je *in vitro* kulturu nutno přenést (přepasážovat) na nové kultivační médium z důvodu vyčerpání živin. Pohybuje se zpravidla v rozmezí 3 až 6 týdnů.

Kontrolní otázky

1. Vysvětlete výhody množení pomocí *in vitro* kultury ve srovnání s klasickými školkařskými metodami.
2. Popište princip fungování flowboxu?
3. Vysvětlete co je rostlinný explantát, jmenujte příklady rostlinných explantátů.
4. Jak je zajištěna sterilita při práci s kulturami *in vitro*?
5. Které fytohormony podporují dělení buněk a následně množení rostlin v kultuře *in vitro*?
6. Které fytohormony podporují tvorbu kořenů a dlouhivý růst?
7. Uveďte, jaké teplotní rozmezí se používá při ozdravování rostlin termoterapií?
8. Jaká chemická látka se nejčastěji používá při chemoterapii?

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



Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

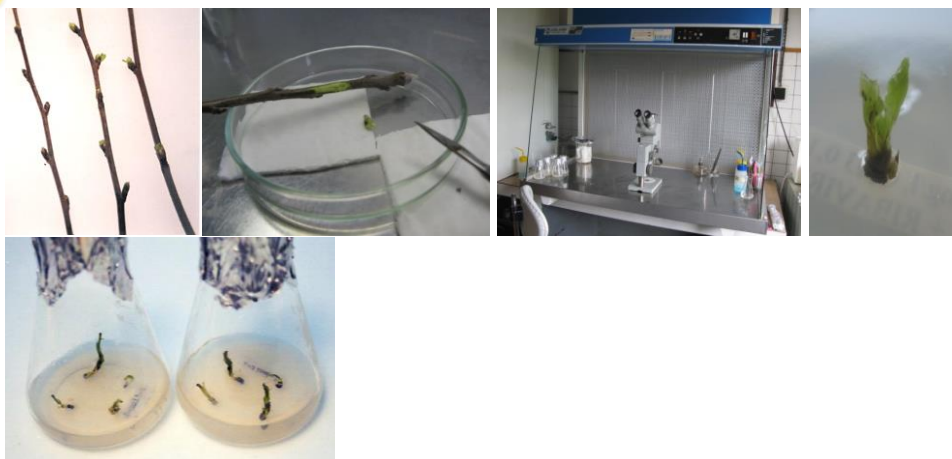
Preparace růstového vrcholu jako výchozího explantátu pro založení *in vitro* kultury.

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.

1.

2.

3.



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 2 (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.