

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE  
FAKULTA ZÁHRADNÍCTVA A KRAJINNÉHO INŽINIERSTVA**

**INDUKCIA ADVENTÍVNEJ ORGANOGENÉZY A JEJ  
EFEKTÍVNE VYUŽÍVANIE PRI RODE *VACCINIUM SPP.***

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2115214

2010

Alexander Valach

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE  
FAKULTA ZÁHRADNÍCTVA A KRAJINNÉHO INŽINIERSTVA

**INDUKCIA ADVENTÍVNEJ ORGANOGENÉZY A JEJ  
EFEKTÍVNE VYUŽÍVANIE PRI RODE *VACCINIUM SPP.***

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Študijný program:	Ovocinárstvo
Školiace pracovisko:	Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Slovenská akadémia vied, Nitra
Vedúca diplomovej práce:	Ing. Jana Kutišová
Konzultantka diplomovej práce:	Ing. Mária Gabriela Ostrolucká, CSc.

Nitra 2010

**Alexander Valach**

## Abstrakt

Cieľom našej práce bolo indukovať proces adventívnej organogenézy, ktorá predstavuje efektívnu techniku reprodukcie rastlín v podmienkach *in vitro*. Za týmto účelom sme testovali vplyv cytokinínov (zeatín, TDZ) na indukciu adventívnej organogenézy pri vybraných odrodách druhu *Vaccinium corymbosum* L. ('Berkeley') a *Vaccinium vitis-idaea* L. ('Linnea', 'Ida' a 'Red Pearl'). Ako primárne explantáty boli použité pletivá listov regenerantov odvodených v kultúre *in vitro*. Listy odrôd 'Berkeley', 'Linnea' a 'Ida' sme kultivovali na WPM médium s obsahom zeatínu a TDZ v koncentráciách 2,2 a 4,4 mg.l<sup>-1</sup>. Pri zeatíne sme nedosiahli indukciu adventívnej organogenézy. Na WPM médiu s TDZ nastala indukcia adventívnej organogenézy pri odrodách 'Berkeley', 'Linnea' na médiu s nižším obsahom TDZ (2,2 mg.l<sup>-1</sup>) a pri odrode 'Linnea' pri koncentrácii 4,4 mg.l<sup>-1</sup>. Indukciu adventívnej organogenézy sme dosiahli len pri odrode 'Berkeley', pri ktorej najvyššiu proliferáciu adventívnych výhonkov (12,8 výhonkov/explantát) sme zaznamenali pri koncentrácii 1,1 mg.l<sup>-1</sup>TDZ. Experimenty naznačujú, že z testovaných odrôd najlepším regeneračným potenciálom disponuje odroda 'Berkeley'.

V ďalších experimentoch sme testovali reakciu pletív odrody 'Berkeley' na selekčné antibiotiká - kanamycín, hygromycín a odrod 'Berkeley', 'Linnea' na antibiotikum cefotaxim, ktoré sme aplikovali do kultivačného média v rôznych koncentráciách so zámerom overiť ich vplyv, prípadne zistiť koncentráciu, ktorá by pre pletivá nebola toxická. Pri použitých koncentráciách kanamycínu sa znižovalo percento prežívajúcich listov s dĺžkou kultivácie a so zvyšovaním koncentrácie príslušného antibiotika. Zvolené koncentrácie sa javili ako príliš vysoké. Najvyššiu toleranciu pletív listov sme pozorovali pri cefotaxíme, a to pri odrode 'Berkeley'. Ako najvhodnejšia koncentrácia cefotaxímu sa ukázala koncentrácia 200 mg.l<sup>-1</sup>.

**Kľúčové slová:** odrody 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida' a 'Red Pearl', adventívna organogenéza, cytokiníny, antibiotiká.

## Abstract

The main purpose of my thesis was to induce adventitious shoot organogenesis, which is very effective technique of *in vitro* plant reproduction. For achievement of this purpose we were testing different types of cytokinins (zeatin, TDZ) for induction of adventitious shoot organogenesis in chosen cultivars of *Vaccinium* spp., specifically *Vaccinium corymbosum* L. - 'Berkeley' and *Vaccinium vitis-idaea* L. - 'Linnea', 'Ida' and 'Red Pearl'. As primary explants were used leaf discs of *in vitro* plants. We cultivated leaf discs of cultivars 'Berkeley', 'Linnea' and 'Ida' on WPM medium supplemented with zeatin and TDZ in concentrations 2,2 and 4,4 mg.l<sup>-1</sup>. No adventitious shoot organogenesis was observed on medium supplemented with zeatin. On WPM medium supplemented with 2,2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ was observed adventitious shoot organogenesis in cultivars 'Berkeley' and 'Linnea' and on a medium supplemented with 4,4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ in cultivar 'Ida'. The highest adventitious shoot proliferation was achieved in cultivar 'Berkeley' (12,8 shoots per explant), on WPM medium supplemented with 1,1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ. According to performed experiments we can claim that the best regeneration potentiation has cultivar 'Berkeley'.

In other experiments we were testing reaction of leaf tissues on selection antibiotics – kanamycin and hygromycin in cultivar 'Berkeley' and in cultivars 'Berkeley' and 'Linnea' we tested also antibiotic cefotaxim. These antibiotics we add to the regeneration medium after genetic transformation, so we tried to find the concentration which is not toxic for the leaf tissues. In used concentrations of kanamycin, percent of lifeful explants decrease with length of cultivation and with increasing of concentration of this antibiotic. Chosen concentrations of antibiotic kanamycin were too high, leaf tissues were sensitive to these concentrations. The highest toleration was achieved by adding antibiotic cefotaxime, in cultivar 'Berkeley'. As the best was showed the concentration 200 mg.l<sup>-1</sup>.

**Key words:** cultivars - 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida', 'Red Pearl', adventitious shoot organogenesis, cytokinins, antibiotics.

## ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaný Alexander Valach prehlasujem, že predloženú diplomovú prácu na tému „Indukcia adventívnej organogenézy a jej efektívne využívanie pri rode *Vaccinium spp.*“ som vypracoval samostatne pod odborným vedením konzultantky Ing. Márie Gabriely Ostroluckej, CSc. a za použitia uvedenej literatúry.

Som si vedomý zákonných dôsledkov v prípade, ak údaje uvedené v práci by neboli pravdivé.

V Nitre 21. mája 2010

.....

Podpis

## **POĎAKOVANIE**

Dovoľujem si poďakovať Ing. Márii Gabriele Ostroluckej, CSc. z Ústavu genetiky a biotechnológie rastlín Slovenskej akadémie vied v Nitre za odborné vedenie a cenné rady pri vypracovávaní diplomovej práce. Súčasne ďakujem vedeniu ÚGBR SAV za poskytnutie možnosti využívať laboratóriá, ako aj technické zariadenie pracoviska a pracovníkom, ktorí mi poskytli pomoc pri experimentálnych prácach.

## **ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK**

MS – Murashige a Skoog médium (1962)

WPM – Woody plant médium (Lloyd and McCown, 1980)

TDZ – thidiazuron (N-fenyl-N-1,2,3-tiadiazol-5-ylurea)

IAA – kyselina  $\beta$ -indolyloctová

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>1 LITERÁRNY PREHĽAD.....</b>	<b>11</b>
1.1 Taxonomické zatriedenie a morfológická charakteristika druhov rodu <i>Vaccinium</i> L. ....	11
1.2 Pôvod druhov <i>Vaccinium corymbosum</i> L. a <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L., história ich šľachtenia a selekcie.....	13
1.3 Ekologické nároky a podmienky pestovania druhu <i>Vaccinium</i> <i>corymbosum</i> L. a <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. ....	14
1.4 Introdukcia produktívnych odrôd druhu <i>Vaccinium corymbosum</i> L. a <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. a ich stručná charakteristika.....	17
1.4.1 Súčasný stav pestovania produktívnych odrôd druhu <i>Vaccinium</i> <i>corymbosum</i> L. a <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. ....	18
1.4.2 Charakteristika odrôd druhu <i>Vaccinium corymbosum</i> L. a <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. ....	19
1.5 Význam a praktické využitie druhov ( <i>V. corymbosum</i> L., <i>V. vitis-idaea</i> L.) rodu <i>Vaccinium</i> L. ....	24
1.6 Metódy rozmnožovania <i>Vaccinium spp.</i> ....	25
1.6.1 Klasické metódy rozmnožovania – generatívna a vegetatívna produkcia.....	25
1.6.2 Rozdelenie a charakteristika kultúr <i>in vitro</i> .....	26
1.6.2.1 Regenerácia a reprodukcia rastlín využitím kultúr <i>in vitro</i> a prednosti uvedeného spôsobu ich rozmnožovania.....	27
1.6.3 Charakteristika procesov morfogénzy v kultúre <i>in vitro</i> a úloha rastových regulátorov pri ich regulácii.....	29
1.6.4 Poznatky o produkcii druhov rodu <i>Vaccinium</i> L. prostredníctvom adventívnej organogénzy.....	36
1.7 Súčasný stav riešenia problematiky transformácií pri drobnom ovocí a ich význam.....	39



1.8	Vplyv antibiotík na adventívnu regeneráciu rastlín s cieľom ich použitia pri genetických transformáciach.....	41
<b>2</b>	<b>CIEĽ PRÁCE.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>44</b>
3.1	Východiskový materiál.....	44
3.2	Založenie kultúry púčikov.....	44
3.3	Sterilizácia prostredia a biologického materiálu.....	44
3.4	Listové explantáty pre indukciu adventívnej organogenézy.....	45
3.5	Kultivačné médiá a podmienky kultivácie.....	45
3.6	Vplyv cytokinínov na indukciu procesu adventívnej organogenézy.....	47
3.7	Testovanie reakcie pletív listov na obsah antibiotík v kultivačnom médiu.....	48
3.7.1	Hodnotenia reakcie pletiva listov na prítomnosť antibiotík v kultivačnom médiu.....	49
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY PRÁCE.....</b>	<b>51</b>
4.1	Testovanie vplyvu rôznych koncentrácií cytokinínov (TDZ, zeatín) na regeneráciu listov odrôd `Berkeley`, `Linnea`, `Ida` a `Red Pearl` .....	51
4.2	Testovanie antibiotík a ich rôznych koncentrácií na listoch.....	56
4.2.1	Testovanie selekčných antibiotík (kanamycín, hygromycín).....	56
4.2.2	Testovanie tolerancie pletív listov k antibiotiku cefotaxime.....	59
<b>5</b>	<b>DISKUSIA.....</b>	<b>62</b>
	<b>ZÁVER .....</b>	<b>65</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....</b>	<b>67</b>
	<b>PRÍLOHY</b>	

## ÚVOD

Druhy rodu *Vaccinium* L. (*Vaccinium vitis-idaea* L. a *Vaccinium corymbosum* L.) patria medzi nekonvenčné druhy drobného ovocia, ktoré v ostatnom čase sa stávajú predmetom záujmu mnohých pestovateľov. Zvýšený záujem zrejme vyplýva z poznatkov o ich význame z hľadiska výživy, zdravia, ale aj pre ich špecifickú chuť. Podľa niektorých autorov patria tieto druhy k najzdravším na svete. Plody majú všestranné využitie - potravinársky priemysel, farmaceutický priemysel, priamy konzum. Využívajú sa aj listy (hlavne vo farmaceutickom priemysle). Uplatnenie nachádzajú aj v záhradách drobnopestovateľov na ich spestrenie, nielen ako úžitkové rastliny, ale aj ako okrasné rastliny. Odrody druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. sú vhodné tiež do okrasnej časti záhrady – do vresovísk, ale aj do skaliek.

Uvedené druhy majú vo svete svoje nezastupiteľné miesto a stále sa stávajú populárnejšie. U nás patria k menej rozšíreným druhom drobného ovocia. Rozširovanie pestovania len pomaly napreduje. Za súčasný stav a rozvoj pestovania na Slovensku vďačíme hlavne Výskumnému ústavu v Krivej na Orave VÚTPHP v Banskej Bystrici (Ing. Danielovi Šimalovi), na ktorom v polovici 90-tych rokov začali s plantážnickým pestovaním viacerých odrôd druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L.. Zistili, že Slovensko má vo vyšších nadmorských výškach vhodné klimatické a aj pôdne podmienky na dopestovanie dostatočného množstva kvalitných plodov. V minulosti sa brusnice získavali len z prirodzených porastov, ktoré sa nachádzali na severe Slovenska na kyslých a najchudobnejších pôdach. Väčšina týchto porastov sa vyskytuje v chránených prírodných rezerváciách a zber plodov je zakázaný. Plantážnické pestovanie v spojení s drobným pestovaním, nedokáže pokryť dopyt na Slovensku po tomto stále významnejšom ovocí. V súčasnosti dopyt je väčšinou zabezpečovaný dovozom zo zahraničia, najmä Poľska. Dominantným pestovateľom a producentom brusníc na svetovom trhu je USA, potom nasleduje Kanada a z Európskych krajín Poľsko, Nemecko a Švédsko.

Najčastejšie používaným spôsobom množenia druhov *Vaccinium vitis-idaea* L. a *Vaccinium corymbosum* L. je vegetatívne množenie, ktoré má viac výhod ako generatívne množenie. Vegetatívnym spôsobom rozmnožovania môžeme zabezpečiť geneticky homogénne potomstvo, čo pri generatívnom množení nie je možné.

Vegetatívne množenie neprináša len výhody. Prenos vírusových chorôb je najväčším problémom tohto rozmnožovania. V ostatných rokoch sa využívajú metódy *in vitro*, zvlášť meristémová kultúra v kombinácii s termoterapiou, pomocou ktorých môžeme uskutočniť ozdravovanie rastlín. Rozvoj rastlinných biotechnológií za ostatné desaťročie významne napreduje, čo malo za následok vznik spoľahlivých a efektívnych reprodukčných metód. Každá prináša špecifické možnosti indukcie morfogénnych procesov, ktoré je možné indukovať kultiváciou izolovaných pletív a orgánov a navyše umožňuje ich priamu a nepriamu regeneráciu, ako aj úspešnú reprodukciu celých rastlín.

Jednou z metód *in vitro*, menej používanou je adventívna organogenéza. Zaslúži si zvýšenú pozornosť, nakoľko proces adventívnej organogenézy je osobitým morfogénnym prejavom, ktorého efektívnosť reprodukcie je prevažne vysoká s možnosťou a perspektívou uplatnenia aj pri genetických transformáciách rôznych rastlinných druhoch, ako aj pri druhoch rodu *Vaccinium* L. Dosiahnutie úspešnej regenerácie a efektívnej mikropropagácie druhov *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L. prostredníctvom adventívnej organogenézy má význam aj z praktického hľadiska. Adventívnou organogenézou je možné získať dostatočné množstva sadbového materiálu, ktoré môže prispieť k pestovaniu a rozšíreniu týchto druhov drobného ovocia na Slovensku.

# 1 LITERÁRNY PREHĽAD

## 1.1 Taxonomické zatriedenie a morfológická charakteristika druhov rodu *Vaccinium* L.

**Rad:** *Ericales* – vresovcotvaré

**Čelad':** *Vacciniaceae* Lindl. - brusnicovité

**Rod:** *Vaccinium* L. – brusnica

Rod je zastúpený 50 druhmi.

Druhy rodu *Vaccinium* L. rozšírené na Slovensku (Marhold a Hindák, 1998):

- *Vaccinium uliginosum* L. – brusnica barinná (šialenica)
- *Vaccinium myrtillus* L. – brusnica čučoriedková (zaužívaný názov - čučoriedka)
- *Vaccinium vitis-idaea* L – brusnica obyčajná  
Futák, Bertová (1982) a Červenka et al., (1986) uvádzajú tento druh pod názvom brusnica pravá, syn. – *Rhodococcum vitis-idaea* L..
- *Vaccinium gaultherioides* Bigelow – brusnica drobnolistá (čučoriedka)
- *Vaccinium intermedium* Ruthe – hybrid druhov *Vaccinium vitis-idaea* L.. a *Vaccinium myrtillus* L. (Kresánek a Krejča, 1982)
- *Vaccinium corymbosum* L. – brusnica chocholíkatá (Marhold a Hindák, 1998)

**Rod:** *Oxycoccus* Hill – kľukva

Zastúpenie druhov tohto rodu na Slovensku podľa Futáka a Bertovej (1982) je:

- *Oxycoccus palustris* Pers – kľukva močiarna  
Syn.: *Vaccinium oxycocoos* L., *Oxycoccus quadripetalus* Gilib., *Oxycoccus vulgaris* Purch.
- *Oxycoccus microcarpus* Turcz. in Rupr. – kľukva drobnoplodá  
Syn.: *Vaccinium oxycoccos* subsp. *Nanum* (Baumg.) Soó, *Oxycoccus nanum* (Baumg.) Thaisz.

***Vaccinium corymbosum* L.** – brusnica chocholíkatá je introdukovaný druh, pochádza zo Severnej Ameriky a patrí do sekcie *Cyanococcus*, do ktorej patria, napr.: *Vaccinium angustifolium*, *Vaccinium myrtilloides*, *Vaccinium boreale*.

Brusnica chocholíkatá je na Slovensku známa aj pod názvami čučoriedka záhradná, čučoriedka vysoká, čučoriedka kanadská, čučoriedka americká a čučoriedka veľkoplodá (Hričovský et al., 2002).

V práci sme používali názvy druhov rodu *Vaccinium* podľa nomenklatúry Marholda a Hindáka (1998).

#### *Morfologická charakteristika rodu Vaccinium L. a niektorých jej druhov*

Rod *Vaccinium* L. - kríčky s drevnatejúcimi, vzpriamenými alebo poliehavými stonkami a so striedavými, celistvými listami. Listy neopadavé alebo opadavé. Kvety jednotlivé alebo v strapcoch. Kalich trváci. Koruna krčiazkovitá, zvonkovitá, guľatá alebo vajcovitá. Peľnice na chrbtovej strane (dorzálny) s 2 príveskami alebo bez nich. Kvety sú obojpohlavné. Plod je bobuľa (Futák a Bertová, 1982).

*Vaccinium vitis-idaea* L. - nízky kríček (10 – 30cm), husto rozkonárený. Má plazivý podzemok. Konáriky vystúpené, oblé, za mlada páperisté. Listy kožovité, neopadavé, krátko stopkaté, obrátene vajcovité až široko elipsovité, celistvookrajové, tupé, slabo podvinuté, na rube s hnedými bodkovitými žliazkami. Kvety vo vrcholových strapcoch, ovisnuté, listene červenkasté. Bobule červené, lesklé, guľaté (Dostál a Červenka, 1992).

*Vaccinium myrtillus* L. – vysoký kríček (30 – 50 cm), husto rozkonárený. Konáre má vystúpené, hranaté, zelené. Listy opadavé, krátko stopkaté, vajcovité až okrúhle vajcovité, niekedy trochu končisté, na báze väčšinou zaokrúhlené, na okraji drobno pílkovité alebo zúbkato až vrúbkovane pílkovité, živozelené, nelesklé. Kvety jednotlivé v pazuchách listov, krátko stopkaté, previsnuté. Bobuľa guľovitá, modročierna, vzácne zelenkastobiela, oinovatená (Futák a Bertová, 1982).

*Vaccinium uliginosum* L. – vysoký krík (20 – 50 cm), konáre vystúpené alebo vzpriamené. Listy opadavé, krátko stopkaté, listová čepeľ 10 – 35 mm dlhá, podlhovasto až široko obrátene vajcovitá, celistvookrajová, na okraji podvinutá, na vrchole zaokrúhlená alebo zriedka tupo končistá, na líci sivozelená, na rube sivá, s výraznou žilnatinou. Kvety previsnuté na vrchole krátkych bočných konárov po dvoch, troch, štyroch, zriedka jednotlivé. Kvetné stopky 4 – 8 mm dlhé, väčšinou dlhšie alebo

rovnako dlhé ako koruna. Plody guľovité alebo hruškovité bobule. V čase zrelosti tmavomodré.

*Vaccinium gaultherioides* Bigelow – nízky, rozprestretý kríček s poliehavými konármi, vysoký najviac 15 cm. Listy husté, malé, 6 – 15 mm dlhé a 4 – 9 mm široké. Kvety jednotlivé, vzácné po dvoch. Bobuľa menšia ako pri *Vaccinium uliginosum* L., so svetloružovou dužinou (Futák a Bertová, 1982).

*Vaccinium corymbosum* L. – je vzrastný krík s opadavými listami, ktorý v dobrých podmienkach dorastá až výšky 2 m. Listy má celokrajové, oválne, sýto zelené, lesklé. Na jeseň sa zafarbujú do červena. Kvety sú obojpohlavné, štvorpočetné. Bobule sú tmavomodré, plocho-guľovitého tvaru s priemerom 10 – 15 mm. Bobule sú modré, dlhé 7 – 10 mm. Dužina je svetlá a farbí menej ako dužina brusnice čučoriedkovej (*Vaccinium myrtillus* L.) (Mareček, 1994; Dostál a Červenka, 1992)

## **1.2 Pôvod druhov *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L., história ich šľachtenia a selekcie**

Brusnica chocholíkatá má rôzne názvy ako napr. čučoriedka hroznovitá, čučoriedka záhradná, veľkoplodá, kanadská. Pochádza zo Severnej Ameriky, kde je od konca 19. storočia intenzívne využívaná v ovocinárstve. V súčasnej dobe sa najviac pestuje v USA, Kanade, Holandsku, Poľsku a Nemecku (Mareček, 1994).

V roku 1906 začal s prípravami na šľachtenie druhu *Vaccinium corymbosum* L. Severoameričan Coville. Jeho prvým krokom bola selekcia vhodných tetraploidných foriem divorastúcich druhov rodu *Vaccinium* na východe USA. Z tejto selekcie pochádzajú odrody 'Brooks', 'Rubel' a 'Russel', ale nedokázali naplniť požiadavky na množstvo a veľkosť bobúľ. Druhý krok v roku 1911 viedol k prvým kríženiam uvedených odrôd, ktoré vznikli z osvedčených foriem divorastúcich odrôd, z ktorých druh *Vaccinium corymbosum* L. bol najviac určujúci a smerodatný pre šľachtenie divorastúcich foriem (Götz a Silbereisen, 1989).

Prvotní osadlíci v Severnej Amerike rýchlo objavili výhody brusníc od Indiánov a prvý popis poslali do Európy pravdepodobne kapitánom Johnom Smithom v roku 1614. On ich popísal ako „červené bobule pomenované Kermes“ (Trehane, 2004).

Druh *Vaccinium vitis-idaea* L. (brusnica obyčajná) rastie dobre na chudobných

pôdach v súvislých porastoch borovicových a smrekových lesoch a suchých rašeliniskách, stredných polohách i vo vyššie položených oblastiach takmer po celej Európe, Ázii a Severnej Amerike. Kultúrne odrody vznikli výberom z pôvodných ekotypov a sú niekoľkonásobne výnosnejšie ako voľne rastúce (Mareček, 1994).

Pestovaním druhu a jeho šľachtením sa najviac venovali a venujú vo Švédsku. V rámci šľachtiteľského programu bolo vo Švédsku sústredených 28 prirodzených lokalít prevažne z tejto krajiny, ale aj Nórska, Fínska, pobaltských republík, strednej Európy, Ruska, Kanady a Japonska. Boli uskutočnené mnohopočetné kríženia s cieľom získania heterozygotných foriem. Vo Švédsku sa v súčasnosti pestuje 12 odrôd, ktoré boli vyšľachtené z divorastúcich rastlín (Gustavsson, 1999). V ostatných rokoch sa rozširuje plantážnicke pestovanie uvedeného druhu nielen vo Švédsku, ale aj v Nemecku a iných krajinách Európy a tiež v USA a Chile. Záujem o pestovanie vyšľachtených, veľmi produktívnych odrôd brusnice sa zvyšuje aj u nás.

### **1.3 Ekologické nároky a podmienky pestovania druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L.**

#### ***Vaccinium corymbosum* L.**

Niekoľkoročné skúsenosti s pestovaním druhu *Vaccinium corymbosum* L. v podmienkach Slovenska majú na Výskumnej stanici na Orave VÚTPH v Banskej Bystrici (Šimala a Ostrolucká, 2005 a, b), kde v roku 1993 bola založená produkčná výsadba a testovaných 12 odrôd uvedeného druhu (Šimala, 1999).

Rastliny brusnice chocholíkatej sú náročné na svetlo a vodu, preto najlepšie rastú a najkvalitnejšie úrody poskytujú na slnečných stanovištiach s dostatkom vlahy. Slnečné počasie a dostatok vlahy je zvlášť potrebné v čase dozrievania a zberu, vtedy je veľkosť i kvalita plodov najvyššia. Pre úspešné pestovanie čučoriedky chocholíkatej je potrebná dĺžka vegetačného obdobia minimálne 150 dní. (<http://www.wellberry.sk/index.php?page=4&jazyk=&obr=4&modul=0> [online]). V týchto zemepisných šírkach s kontinentálnym charakterom počasia je to až po nadmorskú výšku 700 – 750 m s priemernou ročnou teplotou na 6 °C. Predpokladáme tu však len uplatnenie skorých a stredne skorých odrôd. Skúsenosti z pokusov dokazujú, že rastliny sú dostatočne mrazuvzdorné, znášajú bez poškodenia aj pokles zimných teplôt pod - 30 °C, prinášajú však nižšie úrody následkom premrznutia kvetných

púčikov. Mrazuvzdornosť v značnej miere ovplyvňujú také faktory ako je dĺžka vegetačnej doby, úroveň hnojenia (hlavne dusíkom) počas vegetácie, odroda, výkyvy v priebehu počasia v jeseni a počas zimy (aklimatizácia rastlín), výskyt a výška snehovej pokrývky i pestovateľské podmienky.

Brusnica chocholíkatá má špecifické požiadavky na pôdu. Vyžaduje priepustné, ľahké až stredne ťažké piesočnaté až piesočnatohlinité pôdy s dostatkom humusu (nad 3 %) a veľmi kyslou pôdnou reakciou. Optimálne pH pôdy je od 3,5 do 4,5 (v KCl), záhrevné rašelinné pôdy môžu mať pH do 4,9. Pre jej pestovanie sú vhodné aj skeletovité a menej úrodné pôdy, pretože koreňový systém brusnice chocholíkatej žije v symbióze s mykoríznyimi hubami, ktoré napomáhajú získavaniu živín z menej prístupných foriem.

Pred výsadbou pozemok zbavíme burín. Z herbicídov použijeme prípravky na báze glyphosatu. Následne plochu zorieme a vyrovnáme smykovaním, väčší sklon upravíme terasovaním. Pôdu je potrebné pripraviť v dostatočnom časovom predstihu a kvalitne. Pokiaľ sme s prípravou pôdy začali na jar a vysadzovať budeme v jeseni, je potrebné plochu obsiať medziplodinou, ktorú môžeme použiť na zelené hnojenie, aby sme zabránili zaburineniu.

Optimálny termín výsadby sadeníc je skorá jeseň a skorá jar. V tomto období nastáva intenzívny rozvoj koreňového systému, preto rastliny majú dostatok času na adaptáciu a minimalizuje sa presadzovací šok. Brusnica chocholíkatá má koreňový systém rozložený plytko pod povrchom pôdy a tomuto je potrebné podriadiť hĺbku vysádzania. Ak je pôda dostatočne uľahnutá, rastliny (so zemným balom) sadíme takmer zarovno s pôdou, prípadne 30 – 50 mm hlbšie. Kvalita rastlín a pravosť odrôd je dôležitý faktor, ktorý rozhoduje o efektívnosti investície. Najlepšie je použiť vzrastnejšie dvojročné sadenice (množené z odrezkov alebo *in vitro*), ktoré rýchlejšie vchádzajú do obdobia plodivosti (Šimala, 2007a, b)

Novozaložené výsadby sú v prvých dvoch až štyroch rokoch mimoriadne citlivé na zaburinenie. Bezprostredné okolie rastlín udržujeme šírke asi jeden meter bez burín, medziradie zvyčajne zatravníme menej intenzívnymi druhmi tráv. Zatravnenie medzi radmi je nevyhnutné na svahoch ohrozených eróziou. Mulčovanie je veľmi účinný prostriedok v boji proti burinám. Mulč udržuje priaznivé vlhkostné i teplotné pomery v pôde, obohacuje ju o organickú hmotu a v zimnom období znižuje premrzanie pôdy. Brusnica chocholíkatá je veľmi náročná na vlahu a jej rovnomerné rozdelenie, ale



neznáša zamokrenie. Patrí k ovocným druhom menej náročným na živiny a je citlivá na vysokú koncentráciu solí v pôde. Dôležitá je nielen dávka, ale aj forma použitého hnojiva. Optimalizáciu potrieb hnojenia presnejšie stanovíme rozborom pôdy alebo analýzou listov (Šimala, 2007c). Druh *Vaccinium corymbosum* L. kvitne až v máji, takže netrpí zmrznutím kvetov. Dozrieva v júli až auguste v závislosti od odrody a oblastí pestovania. Plodí na dvojročnom dreve, takže na prvé plody si musíme počkať až do druhého roku veku. Plnú plodivosť dosahuje v štvrtom až piatom roku pestovania a dokáže nás odmeniť veľmi peknou úrodou tri až šesť kilogramov z jedného kríka. Životnosť uvedeného druhu je minimálne 25 rokov a niektoré porasty sú v plnej plodivosti aj vo veku 40 až 50 rokov. Plody zberáme približne päť dní po dosiahnutí plného modrého vyfarbenia, kedy dosiahnu lahodnú sladkú chuť, ktorá je osobitá a nenapodobiteľná ([http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/ovocnarska-vyroba/Skusenosti-s-pestovanim-velkoplodych-cucoriedok\\_\\_s513x44672.html](http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/ovocnarska-vyroba/Skusenosti-s-pestovanim-velkoplodych-cucoriedok__s513x44672.html) [online])

#### ***Vaccinium vitis-idaea* L.**

Podobne ako pri druhu *Vaccinium corymbosum* L. boli v r. 1994 na lokalite obce Krivá (Výskumná stanica v Krivej na Orave) založené pokusy s pestovaním odrody 'Koralle' druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. (Šimala, 1999), ktoré sa rozšírilo o testovanie a úspešné pestovanie ďalších odrôd (Šimala et al., 2007).

Je známe, že druhy rodu *Vaccinium* sú acidofilné. Požiadavky na pH pôdy sú podobné ako pri brusnici chocholíkatej (3,5 – 4,5). V prípade, že pôda nemá vhodné pH urobí sa úprava jej kyslosti. Rastliny brusnice obyčajnej majú plytký koreňový systém a z toho dôvodu stačí robiť úpravu kyslosti len do hĺbky 0,2 – 0,3 m. Najvhodnejšie rastliny na vysádzanie sú jednoročné, ktoré by mali byť už dostatočne zakorenené, minimálne s troma výhonkami. V súčasnosti sa používajú väčšinou odrody, ktoré plodia dvakrát za rok. Dôležitým krokom pred výsadbou je aj odstránenie vytrvalých burín. Vhodným na pestovanie tohoto druhu je slnečné stanovište, podobne ako pri brusnici chocholíkatej. Hnojenie nie je až takým významným faktorom v podmienkach pestovania brusnice obyčajnej. Dokáže priniesť dobrú úrodu aj bez prihnojenia. Rast a ďalší vývin rastlín ovplyvňuje podiel organickej hmoty v pôde. Náročnosť brusnice obyčajnej na vodu je nižšia ako pri brusnici chocholíkatej. V prípade, že pestujeme tento druh v južnejších oblastiach Slovenska nároky na vodu sú vyššie ako na severe, kde je potrebné zavlažovanie len minimálne. Na kvalitu vody je brusnica obyčajná tak isto

náročná. Boj proti burinám je neodmysliteľnou súčasťou ošetrovania rastlín. Najlepšie v boji proti burinám sa osvedčilo nastielanie (mulčovanie) okolia rastlín drvenou kôrou a pilinami (z ihličnatých drevín) a aj ihličím, prípadne lesnou hrabankou. Nastielanie zabezpečuje rastlinám rovnomernú vlhkosť a znižuje straty vody z pôdy vyparovaním (<http://www.agroporadenstvo.sk/rv/ovocie/brusnica.htm> [online])

#### **1.4 Introdukcia produktívnych odrôd druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L. a ich stručná charakteristika.**

Prvé pokusy s testovaním pôvodnej brusnice obyčajnej (*Vaccinium vitis-idaea* L.) a šľachtenej odrody 'Koralle' sa začali na Slovensku v roku 1994 na lokalite Krivá na Orave, na ktorej je priemerná ročná teplota vzduchu 6 °C, ročný úhrn zrážok 800 – 900 mm. Pôda je kyslá, piesočnato-hlinitá pôda (pH 3,92). V súčasnosti sa na uvedenej lokalite pestujú úspešne aj ďalšie odrody, napr. 'Ida', 'Linnea', 'Red Pearl'.

Pri brusnici chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) bolo testovaných 12 odrôd: 'Atlantic', 'Berkeley', 'Bluecrop', 'Blueray', 'Blueetta', 'Burligton', 'Darrow', 'Goldtrauben', 'Iranka', 'Jersey', 'Record' a 'Zuckertraube' (Šimala, 2001a). Výsledky pokusov dokázali, že druh *Vaccinium corymbosum* L. je možné úspešne pestovať v týchto podmienkach Slovenska (Šimala, 2001b).

V súčasnosti je vysadených zhruba 16 ha plantáží prevažne v horských oblastiach (Liptov, Orava). Z odrôd sú najviac zastúpené: 'Bluecrop' (55 %), 'Blueray' (25 %) a 'Duke' (15 %). Ostatné odrody tvoria 5 %. Záujem o pestovanie brusnice chocholíkatej v poslednom období značne stúpa, avšak značná rozdrobenosť a nevysporiadané vlastnícke vzťahy k pôde sú najväčšou prekážkou, ktorá bráni podstatnému rozšíreniu pestovateľských plôch na Slovensku. Zakladanie produkčných výsadiel sa najčastejšie realizuje z dvojročných sadeníc množených takmer výlučne technológiou „*in vitro*“ (Šimala, 2007a). Prirodzené porasty brusnice pravej sa na Slovensku vyskytujú od nížin až po vysoké horské polohy. V súčasnosti už existuje veľa vyšľachtených a mimoriadne produktívnych odrôd, ktoré by nemali chýbať v žiadnej záhradke. Uplatnenie nájdú aj ako dekoratívne vždyzelené rastliny v okrasnej časti záhrady (vresoviskách) (<http://www.agroporadenstvo.sk/rv/ovocie/brusnica.htm>).

#### **1.4.1 Súčasný stav pestovania produktívnych odrôd druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L.**

##### **Brusnica chocholíkatá (*Vaccinium corymbosum* L.)**

Perspektívy pestovania tohto druhu na Slovensku sú veľmi veľké, nakoľko je to plodina vhodná na využitie málo úrodných a kyslých pôd, ktorých máme na Slovensku dostatok. Svojou vyššou produkčnosťou, kvalitou a stabilitou úrod dokáže vhodne nahradiť nedostatok plodov brusnice čučoriedkovej. Z jedného hektára plantáže je možné v týchto podmienkach každoročne získať 6 až 12 t plodov, pričom životnosť plantáže je aj viac ako 30 rokov (Šimala, 2002).

##### **Brusnica obyčajná (*Vaccinium vitis-idaea* L.)**

Súčasná výmera prirodzených porastov brusnice obyčajnej a jej celková produkcia na Slovensku je zanedbateľná. V súčasnosti je celá požiadavka plodov brusnice obyčajnej riešená dovozom najmä z Poľska, Pobaltia, Ruska. Z USA sa dovážajú do Európy takmer výlučne plody druhu brusnice veľkoplodej (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). Slovensko má vhodné klimatické podmienky a dostatok neúrodných, extrémne kyslých pôd na zintenzívnenie pestovania brusnice obyčajnej. Svedčia o tom aj výsledky pokusov v Krivej na Orave, ktoré sa tam realizujú od spomínaného roku 1995. Výsledky dokazujú prednosti šľachtených foriem brusnice obyčajnej, hlavne čo sa týka veľkosti úrod a kvality plodov, oproti pôvodnej forme. Brusnica obyčajná je málo náročný, ekologicky prijateľný a zároveň veľmi perspektívny ovocný druh pre tie najkyslejšie a najchudobnejšie pôdy horských oblastí Slovenska. V súčasnosti je k dispozícii už viacero odrôd, vhodných tak pre produkciu plodov, ako aj na dekoratívne účely (Šimala, 2005).

#### 1.4.2 Charakteristika odrôd druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L.

##### *Vaccinium corymbosum* L.

'**Berkeley**' – pôvod odrody je z USA, kde bola vyšľachtená a v roku 1949 a aj zaradená do pestovania. Má silný rast a tvorí rozložené kry so silnými výhonkami. Jeden z charakteristických znakov tejto odrody je veľkosť listov, ktorá je väčšia ako pri ostatných odrodách. Sfarbenie listov je svetlozelené a zo spodnej strany striebřisté. „Bobule sú veľké, až veľmi veľké s výraznou kališnou jamkou. Majú takmer guľovitý tvar s nepatrným sploštením. Dužina je pevná, slabo zelenkavá, pokrytá jemnou šupkou, malo aromatická, vínovosladká, ale dobrá. Plody majú vyrovnanú veľkosť a sú v riedkom, veľkom strapci. Bobule po dozretí majú atraktívnu svetlomodrú farbu s intenzívnym voskovým nádychom, na oslnenej strane striebřisté, akoby „posýpané mukou“. Je cudzoopelivá a aj samoopelivá. Patrí medzi stredne neskoré odrody a jej dozrievanie prichádza o 4 až 6 dní neskôr ako odroda 'Bluecrop'. Medzi jej významné vlastnosti patrí produktivita, pod ktorou sa myslí hlavne veľmi skorá plodnosť a vysoké úrody. Odrode sa darí vo všetkých výrobných oblastiach. Neznáša silné zimné mrazy. V zimách s vysokou snehovou pokrývkou trpí značným poškodením (polámaním) krov vplyvom ťažkého topiaceho sa snehu. Treba používať overený množiteľský materiál, pretože odroda je citlivá na vírusové choroby. Plody sa dajú použiť na priamy konzum, ale aj na zmrazenie (Hričovský et al., 2004).

'**Bluecrop**' – odroda pôvodom z USA, kde bola vyšľachtená krížením hybridov (Jersey x Pioneer) x (Stanley x June) a do pestovania zaradená v roku 1952. V súčasnosti patrí medzi najobľúbenejšie a najviac preferované odrody vo svete. Má vzpriamený ker, guľovitého tvaru, stredne hustý a s bujným rastom. Tmavozelené listy sú väčšie. Rastlina dorastá aj do výšky 2m. Bobule sú veľké až veľmi veľké plochogulovitého tvaru, v stredne hustom strapci, veľkostne veľmi vyrovnané. Majú atraktívnu svetlomodrú farbu s intenzívnym voskovým povlakom (oinovatením). Kališná jamka bobule je veľmi malá. Plody majú veľmi pevnú šupku. V daždivom počasí nepraskajú a po dozretí čiastočne opadávajú. Odolnosť voči chorobám je stredná až vyššia. Neprekážajú jej ani suchšie stanovištia. Mrazuvzdornosť preukazuje v dreve a aj kvete. Ostatné uvedené vlastnosti umožňujú, že je vhodná do vyšších drsnejších polôh, čo sa prejavuje aj na kvalite plodov. Určenie optimálneho termínu zberu je pri

tejto odrode veľmi dôležité a vyžaduje si určitú skúsenosť. Predčasný zber ma za následok vysoký podiel nerovnomerne vyfarbených červenkastých bobúľ. Pre udržanie stability úrod, veľkosti a kvality bobúľ vyžaduje prísnejší rez, pretože má sklon preplodzovať. Význam plodov je v tom, že sú prednostne určené na priamy konzum v čerstvom stave, keďže sú plody dostatočne pevné, znášajú transport a aj skladovanie. Ďalšie využitie je v zmrazovaní alebo použití na výrobu kompótov (Hričovský et al., 2004).

'**Bluejay**' je stredne skorá odroda, ktorej vzrast je silný a ker slabo až stredne rozložité. Plody sú stredne veľké až veľké, slabšie oinovateľé s tendenciou drobenia plodov. Dôležitými vlastnosťami je aj pevnosť a odolnosť voči praskaniu plodov. Ich chuť je vínovo sladká. Mrazuvzdornosť je pomerne dobrá, čo patrí pri tejto odrode k tým lepším vlastnostiam. Odroda je dostatočne prispôsobená aj k mechanizovanému zberu. Plody sa menej využívajú na predaj v čerstvom stave a ich hlavne využitie je v spracovaní (Hričovský et al., 2004).

'**Blueray**' – odroda vyšľachtená v USA v roku 1934. Pochádza z kríženia hybridov (Jersey x Pioneer) x (Stanley x June). Do produkčnej výroby bola zaradená až v roku 1955. Rast je veľmi silný, výhonky vzpriamené, neskôr širšie rozkonárené. Tmavozelené listy sú veľké. Pri porovnaní s odrodou 'Bluecrop' sú podobné. Je samoopelivá a aj cudzoopelivá, pričom cudzoopelenie veľmi pozitívne vplyva na veľkosť bobúľ. Plody sú veľmi podobné odrode 'Bluecrop'. Bobule sú plochogulovitého až gulovitého tvaru, s malou kališnou jamkou, niekedy je ich tvar čiastočne zdeformovaný vplyvom toho, že odroda vytvára kratšie a tesné strapce, ktoré zabraňujú pravidelnému vývinu tvaru bobúľ. Zelenkavá dužina plodu je pevná, sladká a jej chuťové vlastnosti sú veľmi dobré. Dôležitou vlastnosťou je pevnosť plodov počas dažďov a zrenie nastáva dva, tri dni skôr alebo súčasne s odrodou 'Bluecrop'. Okrajové oblasti sú najvhodnejšie pre odrodu 'Blueray', pretože ma lepšiu mrazuvzdornosť v porovnaní s odrodou 'Bluecrop'. V horúcom podnebí sa jej tiež veľmi dobre darí. Jej úrodnosť je dobrá ale má tendenciu preplodzovať. Stabilitu úrod, kvalitu a aj veľkosť bobúľ dokážeme udržať prísnejším rezom a reguláciou plodonosného obrastu. V horských podmienkach Slovenska (Orava) dáva každoročne vyššie úrody ako odroda Bluecrop. Nevhodné polohy sú veterné, kde môže prichádzať k nadmernému ohýbaniu až vylomeniu a to najmä kvôli vzrastu a úrodnosti odrody. Hlavné využitie je na priamy konzum ale vhodné použitie je aj na zmrazenie (Hričovský et al., 2004).

**'Duke'** - ker vzpriamený, otvorený s rozvetveným kmeňom. Je to vitálna a veľmi produktívna odroda. Plody sú veľké, svetlomodré, pevné, príjemnej chuti. Pre túto odrodu je typická veľká vyrovnanosť plodov po celú dobu zberu. Významnými znakmi tejto odrody je pevnosť a krehkosť dužiny. Chuť je priemerná ale zlepšuje sa skladovaním v chlade. Vyžitie plodov je na zmrazovanie i predaj v čerstvom stave (Hričovský et al., 2004).

**'Earliblue'** - najneskoršia odroda. Tvorí pevný vzpriamený ker s pomalším až mierne silným rastom. Plody sú svetlomodré pevné, stredne veľké až veľké, po dozretí neopadávajú a dobre sa oberajú. Majú dobrú chuť. Produkuje prvotriedne plody a je stredne produktívna. Neznáša mrazové kotliny a slabo drenážované (neštruktúrne) pôdy. Mechanizovaný zber je celkom úspešný s cieľom použitia plodov na spracovanie (Hričovský et al., 2004).

**'Herbert'** – odroda pôvodom z USA, kde bola vyšľachtená z odrôd Stanley x ( Jersey x Pioneer ), ale na pestovateľské účely zaradená až v roku 1962. Odroda dostala názov po známom americkom šľachtiteľovi menom Herbert Beebe. Rastie silno, vytvára rozložené stredne vzrastné kry. Výhonky sú hrubé a pomerne pevné. Listy má stredne veľké a tmavozelené. Kvitne neskoro. Dozrieva o 8 až 12 dní neskoršie po odrode 'Bluecrop' a takmer súčasne s odrodou 'Jersey'. Veľmi produktívna odroda, ale menej mrazuvzdorná. Je samoopelivá a aj cudzoopelivá. Medzi dôležité znaky patrí veľkosť plodov, ktoré sú veľké až veľmi veľké. Patria medzi najväčšie z pomedzi všetkých odrôd (Hričovský et al., 2004). Bobule sú veľké a majú výrazne sploštený tvar. Rastú vo veľkých, tesných strapcoch, veľkostne pomerne vyrovnané, s menej osrieneným povrchom, aromatické, vínovokyslej, ale dobrej chuti (po dozretí) (Šimala a Ostrolucká, 2002). Ak je počas zberu daždivé počasie vo vyšších polohách, plody môžu byť horšej chuti i kvality. Táto odroda je najvhodnejšia do teplejších nížinných oblastí, kde sa dá z nej vyťažiť maximum. Nemá náchylnosť na choroby a škodcov. Odporúča sa skôr do záhrad alebo menších produkčných výsadiel ako na intenzívne výsadby z dôvodu náchylnosti na otláčenie. Plody sú aj menej oinovateľé. Sú hlavne určené na priamy konzum (Hričovský et al., 2004).

**'Jersey'** – pôvod odrody je v USA, kde bola vyšľachtená v roku 1916, a tým sa zaraďuje medzi najstaršie vyšľachtené odrody. Do pestovania bola zaradená v roku 1928 a pochádza z odrôd Rubel x Grower. Rast má silný. Kry môžu dosahovať cez dva

metre, pritom nemajú sklon k zahusťovaniu. Žltozelenú farbu majú výhonky hlavne v zime. Listy sú veľké, širokooválneho tvaru. V našich klimatických podmienkach dostatočne mrazuvzdorná (Hričovský et al., 2004). Bobule sú stredne veľké s výraznou kvetnou jamkou, veľkostne málo vyrovnané. Majú vínovosladkú a dobrú chuť (po dozretí). Sú vhodné na priamy konzum a na spracovanie. Odroda sa odporúča do záhradiek v nižších polohách s dlhším vegetačným obdobím (Šimala a Ostrolucká, 2002).

'**Spartan**' – ker má rovnomerný rast so strednou silou. Úrodnosť dosahuje priemerné hodnoty. Plody sú z kvalitatívneho hľadiska na vysokej úrovni. Bobule sú dostatočne veľké s výbornou chuťou, preto sú určite odporúčané na priamy konzum. Kvitne neskoro, ale dozrieva skoro a je mrazuvzdorný. Bobule sú veľmi atraktívne, často s povlakom na štvrtine plodu. Vyžaduje špecifické polohy s ľahkými dobre drenážovanými pôdami (Hričovský et al., 2004).

#### ***Vaccinium vitis-idaea* L.**

'**Ida**' – stredne skorá odroda, vyšľachtená v roku 1997 vo Švédsku. Vznikla voľným opelením z východiskového materiálu pochádzajúceho z provincie Smaland. Rast rastlín je vzpriamený a silný. Vytvára nižšie, kompaktné, veľmi dekoratívne kry guľatého tvaru. Dospelé rastliny dosahujú výšku len 0,1 – 0,2 m. V porovnaní s odrodou 'Koralle' sa slabšie rozkonáruje podzemnými výhonkami. Listy sú tmavozelené, pomerne veľké a lesklé, na vrchnej strane s výraznou žilnatinou. Bobule sú guľovitého tvaru, atraktívnej žiarivočervenej farby, veľké až veľmi veľké (0,5 – 0,8 g). Oproti odrode 'Linnea' má nižší obsah kyselín a antokyánových farbív. Bobule sú uložené v podlhovastom, krátkom, stredne hustom strapci (5 – 7 bobúľ). Veľkostne sú menej vyrovnané. Kvitne dvakrát za vegetáciu a aj dozrieva v termínoch ako odroda 'Koralle', preto sa odporúča na výsadbu len po nadmorskú výšku 750m. Je dostatočne mrazuvzdorná, stredne úrodná odroda (100 – 150g plodov na 1 ker) (Šimala, 2005).

'**Koralle**' – pôvod odrody je v Holandsku, kde bola vyšľachtená (v r.1969). Jej prvotné využitie bolo ako okrasná rastlina, až neskôr ju zaradili na produkciu plodov. Odroda disponuje dobrou produkciou, nadpriemerným vzpriameným rastom (0,3 m). Koreňový systém, listy ale aj kvitnutie a dozrievanie je veľmi podobné ako pri odrode 'Ida'. Bobule sú guľatého až podlhovastého tvaru, stredne veľké až malé (0,3g),

atraktívnej jasnočervenej farby s menším obsahom kyselín. Plody má umiestnené vo veľkom, podlhovastom, stredne hustom strapci. Sú pomerne vyrovnanej veľkosti, ale nerovnomerne dozrievajúce najmä v druhom, jesennom zbere. V prvej úrode je podiel hniloby plodov vyšší, v druhej úrode sa hniloba plodov vyskytuje len nepatrnej miere. Najvhodnejšie polohy sú pre odrodu humózne, piesčité, dobre drenážované, a to z hľadiska vysokých úrod. Prvý zber sa robí ručne, pretože môže prísť k porušeniu kvitnúcich rastlín alebo násady plodov. Vo väčších produkčných výsadbách sa prvý zber nepoužíva. Oveľa dôležitejší je druhý zber, a to kvôli kvalite plodov a veľkosti úrody. Okrem ručného zberu je pri druhom (jesennom) zbere možné použiť aj mechanický (Hričovský et al., 2004).

**'Linnea'** – pochádza tak isto ako odroda 'Ida' z Balsgard zo Švédska, kde ju vyšľachtili v roku 1997. Patrí medzi novšie, mrazuvzdorné a hlavne perspektívnejšie odrody, a tým má lepšie možnosti využitia v produkčných výsadbách. Tvorí silné, vzrastné, vzpriamene rastúce, slabo sa rozkonárujúce, kompaktné kry. Dospelé rastliny majú výšku od 0,15 – 0,25 m. Listy sú tmavozelené, trochu väčšie od iných odrôd. Kvitne veľmi skoro až skoro, súčasne s odrodou Koralle, ale dozrieva neskoro. Plody sú stredne veľké (0,33g), vyrovnanej veľkosti, uložené vo veľkom a hustom strapci, pomerne rovnomerne dozrievajúce. Bobule majú guľovitý až slabo plochogulovitý tvar. Plody sú výraznej tmavočervenej farby, kyslé, veľmi odolné voči hnilobe. Táto odroda je vhodná do záhrad ale tak isto aj do veľkovýroby, ale na Slovensku ešte pomerne málo vyskúšaná (Hričovský et al., 2004).

**'Sanna'** – pôvod ako pri odrodách 'Ida' a 'Linnea'. Odroda bola vyšľachtená v roku 1988. Tvar kra je guľatý so stredne silným až silným rastom. Výška rastliny 0,2 – 0,3 m. Vytvára veľké strapce. Bobule sú stredne veľké až veľké(0,36g), v stredne hustom strapci - veľkostne menej vyrovnané, pomerne rovnomerne dozrievajúce. Odroda dosahuje vynikajúce úrody v ideálnych podmienkach (slnečné stanovište, humózne, piesčité, dobre drenážované). V súčasnosti patrí medzi odrody najvhodnejšie do veľkovýroby (Hričovský et al., 2004).

**'Sussi'** - licenčne chránená odroda. Rast kra je rozložitejší a rastliny dosahujú výšku 0,15 – 0,25 m. Vhodná do skaliek (vresovísk). Plody sú stredne veľké až veľké, výbornej kvality. V strapci hromadne dozrievajúce, rozmiestnené na povrchu kra. Úroda z jedného kra môže byť až 200 gramov. Je dobrým opelovačom pre odrodu 'Sanna'. (Hričovský et al., 2004).



'Red Rearl' – stredne produktívna odroda , vyšľachtená v Holandsku. Kry rastú vzpriamene a dosahujú výšky až 0,35 m. Plody sú stredne veľké až veľké tmavočervenej farby a výbornej kvality. Listy sú lesklé tmavozelené, veľmi dekoratívne. Úrodu prináša dvakrát ročne. Je dobrým opel'ovačom pre odrodu 'Koralle'. (Hričovský et al., 2004).

## 1.5 Význam a praktické využitie druhov ( *V. corymbosum* L., *V. vitis-idaea* L.) rodu *Vaccinium* L.

### Druh *Vaccinium corymbosum* L.

Plody čučoriedok právom zaraďujeme medzi najzdravšie ovocie. Obsahujú vitamíny, minerálne látky a farbivá (antokyany), ktoré majú mimoriadne priaznivý vplyv na ľudský organizmus. Zvyšujú obranyschopnosť, podporujú rast u detí, výborne pôsobia proti hnačkám, slúžia ako podporný prostriedok pri liečbe cukrovky a reumatizmu (Dušková a Kopřiva, 2003). Majú ochranný účinok voči srdcovým chorobám, rakovinovým ochoreniam a starnutiu. Bioaktívne extrakty lesných čučoriedok, bohaté na antokyaníny a proantokyanidíny, vykazujú výraznú antioxidačnú aktivitu. Antioxidačná kapacita čučoriedok je ovplyvňovaná rôznymi faktormi (teplota, pH, oxidácia). V porovnaní s lesnými jahodami a malinami je asi 3-násobne vyššia, ale obsah vitamínu C asi 4-násobne nižší. Čučoriedky sú považované za jeden z najbohatších zdrojov antioxidačných látok a potvrdili v nich tiež lineárny vzťah medzi antioxidačnou kapacitou a celkovým obsahom antokyanínov a polyfenolov. V šťave čučoriedok (výťažok 74 až 83%) obsah antokyanínov predstavuje 13 až 23% a celkový obsah polyfenolov 36 až 39%. Zloženie a obsah fenolových zlúčenín v čučoriedkach sa mení vo vzťahu k odrode, ročnému obdobiu, ako aj lokalite rastu. Významnými zložkami čučoriedok sú esenciálne prvky (K, Ca, P, Mg, Al, B, Cu, Fe, Na, Mn a Zn), pričom priaznivým faktorom pre ľudský organizmus je nízky obsah Na (Vollmannová et al., 2009). Čučoriedková šťava, konzervované čučoriedky alebo marmeláda z plodov sú vynikajúcim prostriedkom na liečbu zápalov ústnej dutiny a hltana (Volák et al., 1983).

## **Druh *Vaccinium vitis-idaea* L.**

Brusnica obyčajná je pre svoju špecifickú chuť plodov a liečivé účinky u konzumentov čoraz obľúbenejšia. Plody obsahujú hlavne cukry, organické kyseliny, pektíny, minerálne látky (P,K), flavonidy, glykozidy (arbutín) a vitamíny (C a P). Vyšší obsah kyseliny benzoovej v plodoch zvyšuje ich trvanlivosť. Ovocie možno spracovať na kompóty, šťavy, džemy aj likéry, dajú sa zmrazovať i sušiť. Majú široké použitie v potravinárskom priemysle. Plody slúžia ako podporný prostriedok v prevencii a liečbe zápalov močového ústrojenstva, reumatizmu a dny. Pôsobia dezinfekčne na tráviacu sústavu, používajú sa pri liečbe nachladnutí (znižujú horúčky). Zvýšená konzumácia plodov sa však neodporúča ľuďom náchylným na tvorbu obličkových kameňov (Šimala, 2005).

## **1.6 Metódy rozmnožovania *Vaccinium* spp.**

### **1.6.1 Klasické metódy rozmnožovania - generatívna a vegetatívna produkcia**

#### ***Generatívne rozmnoženie***

Rozmnoženie semenom predstavuje najprirodzenejšiu metódu množenia. Veľkou nevýhodou je však štepenie znakov a vlastností. Rastliny vzniknuté zo semien majú len malé percento zhodných alebo podobných vlastností materskej rastline (Dušková a Kopřiva, 2003).

#### ***Vegetatívne množenie***

*Množenie drevnatými odrezkami* je najpoužívanější spôsob množenia. Odrezky sa odoberajú v marci až apríli. Silné, zdravé a dobre vyzreté výhony, tenšie ako ceruzka, dávajú najlepší množiteľský materiál. Výhony mali byť dlhé od 53 - 75 cm. Neodoberáme výhony tenké a mäkké, ani výhony s kvetnými púčikmi. Škôlkárske podniky odoberajú výhony už vo februári a ponechávajú ich vo vlhkej rašelini pri teplote 0 – 5°C. Výhony sa narežú na 10 – 12 cm dlhé odrezky s 5 – 6 púčikmi. Spodný rez musí byť vedený nad púčikom. Pretože odrezky korenia pri teplote okolo 20 °C, musia byť umiestnené v skleníku. Najvhodnejšia zmes pre zakoreňovanie odrezkov sú tri diely čistej rašeliny a jeden diel piesku. Rast koreňov podporuje použitie vhodného stimulátora. Odrezky korenia len pri dodržanej primeranej vlhkosti a vzdušnosti

substrátu, pri vyššej vzdušnej vlhkosti, dostatku svetla a teploty okolo 20 °C. Pri silnom slnečnom osvetlení je nutné zatienie. Koncom júla je vhodné podporiť rast koreňov slabšími dávkami hnojív. Hnojí sa dvakrát v intervale asi desiatich dní. Od polovice augusta sa odrezky už hnojiť nesmú.

*Množenie bylinnými odrezkami* je spôsob sa používa zvlášť v lete. Tieto odrezky musia byť umiestnené v množiareni s regulovanou teplotou a vlhkosťou. Najvhodnejšia teplota je v rozmedzí 20 – 25°C. Zakorenené odrezky v novembri presadíme do kontajnerov a prenesieme do skleníka. Na jar ďalšieho roku zakorenené odrezky vysádzame do voľného priestranstva.

*Potápanie* – po odkvitnutí silnejšie výhony, ktoré v spodnej časti zdrevnateli zohneme na zem, prichytíme ich vidlicou alebo dreveným kolíkom a nahrnieme na ne asi desať centimetrov vysokú vrstvu zeminy. Na jeseň sú už výhony zakorenené a môžeme ich oddeliť (Dušková a Kopřiva, 2003).

## 1.6.2 Rozdelenie a charakteristika kultúr *in vitro*

Kultúry *in vitro* rozdeľujeme na:

- **Organizované kultúry** – predstavujú orgány alebo ich základy, ktoré sú pestované v podmienkach *in vitro* spôsobom, ktorý umožňuje ich rast a diferenciaciu, pričom sa zachováva ich stavba a funkcia. Príkladom organizovaného rastu sú:
  - Meristémové kultúry
  - Kultúry rastových vrcholov
  - Nodálne kultúry
  - Embryokultúry
  - Kultúry izolovaných koreňov
- **Kultúry s neorganizovaným rastom** – ak do vývinového cyklu explantátovej kultúry je zahrnutá fáza dediferenciácie a výsledkom kultivácie *in vitro* je produkcia pletiva, ktorému chýbajú črty organizovaných štruktúr. Genotyp regenerantov je ovplyvnený touto cytogeneticky nestabilnou fázou kultúry *in vitro*. Výsledkom sú genetické a karyologické zmeny a odlišný genotyp a fenotyp regenerantov.

Typickým príkladom neorganizovaného rastu sú:

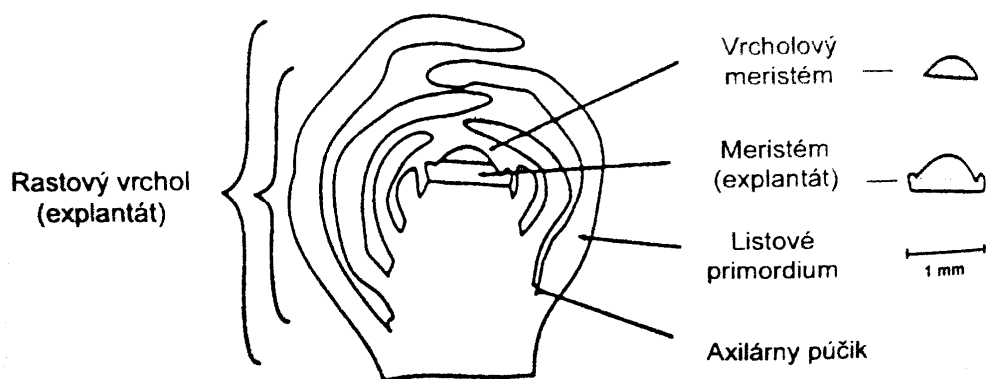
- Kalusové kultúry
- Bunkové suspenzné kultúry
- Protoplastové kultúry
- Peľnicové a mikrospórové kultúry

*Organizované kultúry* – diferencované bunky orgánov alebo pletív izolovaných z donorových rastlín najprv prechádzajú procesom dediferenciácie. Výsledkom je proliferácia neorganizovane rastúceho kalusu, z ktorého sa zmenou kultivačných podmienok indukujú procesy morfogénzy a regenerujú sa kompletne rastliny. Regenerácia rastlín z nešpecializovaných a neorganizovaných buniek kalusu sa označuje ako nepriamy spôsob regenerácie, a to nepriamou organogenezou alebo nepriamou somatickou embryogenezou (Salaj a Blehová, 2006).

#### 1.6.2.1 Regenerácia a reprodukcia rastlín využitím kultúr *in vitro* a prednosti uvedeného spôsobu ich rozmnožovania

**Meristémové kultúry** sú podľa Hay a Tsiantisa (2005) pletivá, izolované z púčikov a pestované v podmienkach *in vitro*. Meristémy sú zhľuky nediferencovaných buniek, ktoré sa zakladajú počas embryogénzy rastlín. Predstavujú pletivo najmladších častí v rastlinnom organizme, ktorého bunky vyznačujú značnou totipotenciou a schopnosťou intenzívne sa deliť. Nachádzajú sa na vegetačnom vrchole výhonku a rastovom vrchole hlavného koreňa. Castellano a Sablowski (2005) tvrdia, že nové bunky neustále produkované meristémami podliehajú diferenciácii, formujú pletivá a nové orgány, a tak vytvárajú základnú stavbu rastlinného organizmu.

Meristémové kultúry zakladáme izoláciou a kultiváciou miniatúrnych meristémov rastových vrcholov. Explantáty izolujeme z apikálnych alebo laterálnych púčikov. V čase izolácie ich dĺžka dosahuje 0,2 – 1 mm, obsahujú apikálny meristém a 2 listové primordiá (Salaj a Blehová, 2006).



**Obrázok 1.** Rastový vrchol s lokalizáciou meristému, listových primordií a axilárnych púčikov ( George, 1993).

Rastové centrá výhonkov môžeme kultivovať bez prerušenia ich organizovaného rastu. Výsledkom sú výhonky, ktoré sa môžu zakoreniť, čo má veľký praktický význam z hľadiska mikropropagácie rastlín.

Z praktického hľadiska sú meristémové kultúry veľmi cenné a významne, nakoľko umožňujú elimináciu vírusových chorôb. Pri založení meristémovej kultúry platí všeobecná zásada, že čím menší je primárny explantát, tým väčšia nie vyššia je pravdepodobnosť odvodenia bezvírusového jedinca, ale prežívanie izolovaných meristémov klesá so znižujúcou sa veľkosťou. Neznamená však, že explantát zbavený patogénov si svoju odolnosť zachováva trvale. Na úplnú likvidáciu vírusov sa využíva termoterapia a chemoterapia (Preťová, 1995).

Produktom meristémovej kultúry je fenotypovo homogénne a geneticky stabilné potomstvo. Odchýlky prevažne odrážajú suboptimálne podmienky kultivácie a majú charakter vznikajúcich modifikácií. Frekvencia mutácií v klonovom potomstve neprevyšuje frekvenciu mutácií pri množení tradičným spôsobom vegetatívneho klonovania (Kamenická a Vizárová, 2000).

**Kultúra apikálnych a axilárnych púčikov** – proliferácia axilárnych výhonkov z izolovaných apikálnych alebo axilárnych púčikov je iniciovaná vplyvom relatívne vysokej koncentrácie cytokinínu. (George, 1993). Je to najčastejšie používaná a veľmi spoľahlivá metóda mikropropagácie rastlín. Z tejto kultúry sa odvodí kultúra výhonkov.

**Kultúru výhonkov** – cieľom tejto kultúry je multiplikácia opakovaným axilárnym vetvením. Explantát obsahuje intaktný apikálny meristém a dosahuje približne dĺžku 20 mm. Explantáty sa izolujú z aktívne rastúcich výhonkov. Ak je

možné, odporúča sa použiť explantát skôr väčších rozmerov. Zaisťuje to lepšiu manipuláciu pri izolácii a zakladaní kultúry a obsahuje viac axilárnych púčikov. Pri väčších rozmeroch explantátov je nevýhodou komplikovanejšia sterilizácia. Pomerne často sa používajú ako explantáty výhonky získané z meristémových kultúr, ktoré sú bez vírusov (Salaj a Blehová, 2006).

**Nodálne kultúry** (segmentované a nesegmentované). Primárnym explantátom môžu byť hlavný alebo laterálny výhonok s viacerými nódiami (uzlami). Kultivácia sa uskutoční nasledovne: Výhonok zbavíme listov, pokrájame na segmenty – jednodálne alebo viacnodálne. Každý segment obsahuje púčik (jednodálny segment) a viacnodálny segment viac púčikov. Segmenty položíme na médium. Teoreticky z každého uzla, ktorý obsahuje púčik vyrastie výhonok, ktorý môžeme odizolovať a zakoreniť alebo použijeme ako explantát na opakovanú multiplikáciu. Ďalšou metódou je kultivácia nesegmentovaných výhonkov s uzlami (nesegmentované nodálne kultúry). Po odstránení listov výhonok s pazušnými púčikmi položíme v horizontálnej polohe na médium. Teoreticky z každého uzla môže vyrásť nový výhonok, ktorý zakoreníme, alebo použijeme na opakovanú multiplikáciu (Salaj a Blehová, 2006).

### **1.6.3 Charakteristika procesov morfogénzy v kultúre *in vitro* a úloha rastových regulátorov pri ich regulácii.**

Morfogénza je proces diferenciácie štruktúr a orgánov. Diferenciácia rôznych nových organizovaných štruktúr a orgánov na explantátoch, kultivovaných na živnom médium, je prejavom totipotencie somatických rastlinných buniek. V podmienkach *in vitro* môžeme regulovať smer procesu morfogénzy. Morfogénny proces vzniku a diferenciácie štruktúr a orgánov, ktoré v pôvodnom explantáte neboli, môže viesť k organogénze alebo embryogénze, a to modifikáciou vnútorných a vonkajších faktorov morfogénny. Morfogénzou *de novo* diferencované orgány (adventívne púčiky, somatické embryá) nazývame adventívne orgány (Salaj a Blehová, 2006).

Regenerácia v prírodných podmienkach a regenerácia *in vitro* má niekoľko spoločných charakteristík, avšak špecifické podmienky kultivácie navodia niektoré odlišné procesy (napr. dediferenciáciu), ktoré sa v prírodných podmienkach vyskytujú zriedkavo alebo vôbec (Hrubíková et al., 2009).

Proces morfogénézy *in vitro* (v smere organogénézy alebo embryogénézy) ovplyvňujú viaceré faktory, z ktorých najdôležitejšie sú:

- kultivačné podmienky (zloženie živného média, zvlášť typ a koncentrácia rastových regulátorov, fyzikálne faktory),
- genotyp kultivovaného rastlinného materiálu,
- fyziologický stav explantátu (rastová fáza, obsah endogénnych rastových regulátorov, zdravotný stav donorovej rastliny).

Morfogénéza začína bunkovým delením, ktoré vedie k vzniku buniek meristemického typu. Zoskupením buniek takéhoto typu sa vytvoria podmienky, ktoré dovoľujú meristemickým bunkám, zoskupeným v meristemoidoch, za istých podmienok reagovať a smerovať k organizovanému vývinu na vyššej úrovni. Táto predstavuje reguláciu polaritu a medzibunkový prenos informácií o funkčnom stave okolitých buniek. (Bobák a Šamaj, 1999).

Základom adventívnych orgánov alebo somatických embryí sú morfogénne meristémy. Morfogénne meristémy sa zakladajú buď priamo v pôvodnom explantáte diferencovaných buniek (priama cesta) alebo v neorganizovanom kalusovom pletive, ktoré je výsledkom dediferenciácie pletív pôvodného explantátu (nepriama cesta).

Salaj a Blehová (2006) uvádzajú nasledovné štádia morfogénézy:

- Štádium dediferenciácie – v tomto štádiu bunky nadobudnú schopnosť reagovať na morfogénny stimul. Nastáva ich dediferenciácia.
- Štádium indukcie – v tomto štádiu sú bunky determinované na diferenciaciu špecifického orgánu (koreň, výhonok) a rozhodujúce je špecifické pôsobenie rastových regulátorov.
- Štádium morfolologickej diferenciacie a rastu – po determinácii na špecifický vývinový program v druhom štádiu proces prebieha ďalej. Postupne sa objavujú diferencované štruktúry, ktoré sú zvyčajne aj morfologicky rozlíšiteľné. Toto štádium zvyčajne už nevyžaduje pôsobenie rastových regulátorov.

### ***Rastové regulátory***

Rastlinné rastové regulátory boli prvýkrát objavené v rastlinách na začiatku dvadsiateho storočia. Endogénny rastový regulátor sa nazýva rastovým hormónom (fyttohormón) - v akademickej terminológii “organické zlúčeniny syntetizované v jednej časti rastliny a translokované do inej časti rastliny, kde vo veľmi nízkych koncentráciách spôsobujú fyziologické reakcie”. Súčasné poznatky, ako aj komerčné použitie rastových regulátorov sa zvyšovalo. Zlúčeniny extrahované predtým z rastlín sa začali vyrábať synteticky, a tak v súčasnosti máme rastové regulátory prírodného (fyttohormóny), ale aj syntetického pôvodu. Syntetický rastový regulátor je štruktúrou podobný rastlinnému hormónu ale nepovažuje sa za rastlinný hormón (Ferguson a Lessenger, 2006).

- Rastové regulátory, ktoré vplývajú na procesy rastu a vývinu pozitívne, označujeme ako *stimulátory* (auxíny, cytokiníny, gibberelíny,).
- Látky, ktoré brzdia rast a vývin rastlín nazývame *inhibítory* (napr. kyselina abscisová, fenolové látky, etylén).
- Stimulátory vo vyšších množstvách môžu rast inhibovať a inhibítory v nízkych množstvách stimulovať (Hudák et al., 1991).



**Tab. 1. Rozdelenie rastových látok a rastových regulátorov (Šebánek et al., 1983)**

<b>Natívne – rastové látky (fytohormóny)</b>	
<b>Rastové stimulatory</b>	<i>Auxíny</i>
	IAA – kyselina indolyl-3-octová
	IAN – indolyl-3-acetonitril
	PAA – kyselina fenylloctová
	<i>cytokiníny</i>
	zeatín – 4-hydroxy-3-metyl- <i>trans</i> -2-butenylaminopurín
	zeatínribozid
	IP – izopentenyladenín
	IPA - izopentenyladenozín
	difenylmočovina
	<i>Giberelíny</i>
	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> , ...A <sub>n</sub> atď.
<b>Rastové inhibitory</b>	ABA – kyselina abscisová
	xantoxín
	fenolické látky
	kyselina jasmonová
<b>Etylén</b>	
<b>Syntetické – rastové regulatory</b>	
<b>Auxinoidy</b>	IBA – kyselina indolyl-3-maslová
	NAA – kyselina $\alpha$ -naftylloctová
	2,4-D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
	2,4,5-T – kyselina 2,4,5-trichlórfenoxyoctová
	MCPA – 4-chlór-2-metyl-fenoxyoctová
<b>Cytokiníny</b>	kinetín – 6-furfurylaminopurín
	BA - benzyladenín
	PBA – tetrahydropyranyl-benzyladenín
<b>Retardanty</b>	MH – hydroxid kyseliny meleínovej
	CCC - chlórcholínchlorid
	TIBA – 2,3,5-trijódbenzoová
<b>CEPA</b>	kyselina 2-chlóretylfosfonová

*Auxíny* – patria medzi prvé objavené rastlinné hormóny. V roku 1926 ich identifikovali ako chemický prenášač, ktorý sa pozitívne podieľal na fototropizme pri klíčnych rastlinkách ovsa. Jeho podrobnejšie charakterizovanie v tej dobe nebolo možné, pretože sa nachádzal v rastlinách vo veľmi nízkej koncentrácii (Mauseth, 2003). Účinky auxínu boli známe už pred jeho identifikáciou. Dôkazom boli pokusy na koleoptilách ovsa, uskutočnené technikou agarových bločkov. Najrozšírenejší auxín (natívny) je kyselina  $\beta$ -indolyloctová (IAA). K základným charakteristickým vlastnostiam IAA patrí:

- Stimulácia predlžovacieho rastu
- Účinnosť IAA je závislá od jej endogénnej koncentrácie a pomeru k iným hormónom
- V rastlinných pletivách sa pohybuje aktívne (Zima et al., 2002).

Syntéza IAA prebieha prevažne vo vrcholových meristémoch a v mladých častiach rastlín. Obsahuje ju rastový vrchol, vrcholové pletivo výhonku, rastúce listy, korene, embryá i klíčne rastliny, semená, ale aj kvetné púčiky a vyvíjajúce sa kvety. Hladinu IAA v rastlinách pomáhajú regulovať faktory, ktoré kontrolujú jej koncentráciu. Prvým faktorom je degradácia, prípadne deštrukcia IAA oxidáciou prostredníctvom IAA-peroxidázy v prítomnosti iónov  $Mn^{2+}$ . Tento inaktivujúci enzýmový systém obsahujú pletivá, najmä v koreňoch. Deštrukciou spôsobuje aj prítomnosť katalyzátora riboflavínu pôsobením svetla, najmä UV. Druhým faktorom je množstvo prekursoru tryptofánu. Tretím kontrolným faktorom regulácie auxínu je rýchlosť transportu auxínu z miesta produkcie na miesto pôsobenia. Transport IAA v rastlinách prebieha symplastom polárne, t. j. z vrcholového meristému bazipetálne smerom dolu k báze stonky. V koreni sa pohybuje akropetálne od bázy k vrcholu. Nezávisí od koncentračného gradientu (Hudák et al., 1991).

Auxíny sa veľmi často používajú pri mikropropagácii rastlín. Podporujú rast kalusov, bunkových suspenzných kultúr a spolu s cytokinínmi regulujú procesy morfogénzy. Významnú úlohu plnia pri indukcií somatickej embryogenézy a zakoreňovaní. Pozitívny účinok majú aj pri stimulácii predlžovacieho rastu.

Najpoužívanejšie syntetické zlúčeniny s vlastnosťami auxínov:

- Kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA) – používaná ako jedna z komponentov v zakoreňovacích živných médiách alebo v malom množstve spolu s vyššími koncentraciami syntetického cytokinínu BAP stimuluje adventívnu organogénzu pri

explantátoch, ktoré neobsahujú meristematické pletivá (Pierik, 1997).

- Kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D) – pri biosyntéze karotenoidov v bunkovej suspenznej kultúre sa prejavil jej stimulačný efekt (Mok, 1976), inak má inhibičný vplyv na procesy organogenézy. Dlhodobá kultivácia kalusov na médiách s 2,4-D kyselinou môže byť príčinou ich genetickej nestability (Salaj a Blehová, 2006). Niektoré prípady popisujú inhibičný vplyv 2,4-D aj na produkciu sekundárnych metabolitov v bunkových suspenzných kultúrach (Rao a Ravishankar, 2002), a preto sa na ich kultiváciu používajú média s prídavkom NAA alebo IAA.
- Kyselina 3-indolylmaslová (IBA) – využíva sa zvlášť na indukcie rizogenézy.
- Kyselina 4-chlórfenoxyoctová (4-CPA), kyselina 2,4,5-trichlór-fenoxyoctová (2,4,5-T), kyselina 3,6-dichlór-2-metoxibenzoová (dicamba) patria k menej používaným syntetickým zlúčeninám, ktoré vykazujú auxínovú aktivitu. Používajú sa na indukciu kalusogenézy a nepriamej somatickej embryogenézy pri jednokličnolistových rastlinách.

Na indukciu morfogénézy a zakoreňovania stonkových výhonov v podmienkach *in vitro* je odporúčaná aplikácia NAA alebo IBA (Salaj a Blehová, 2006).

**Cytokiníny** - V roku 1950 Skoog a Miller potvrdili zintenzívnenie delenia buniek v kalusových kultúrach tabaku po pridaní DNA kvasiniek. Neskôr identifikovali aj účinnú látku, ktorú nazvali kinetín, Chemicky sa jedná o 6-furfuryl-amino-purín. Po identifikácii ďalších látok s podobnými účinkami dostali spoločný názov cytokiníny (Zima et al., 2002).

Cytokiníny v rastlinách sa nachádzajú v dvoch formách:

1. voľnej – syntetizujú sa najmä v koreňoch mladých rastlín a
2. viazanej – nemajú syntézu lokalizovanú v určitých pletivách alebo orgánoch.

Cytokiníny sa transportujú xylémom i floémom. Predpokladá sa, že biosyntéza cytokinínov v rastlinách prebieha v koreňoch, odkiaľ sa premiestňuje k zdroju IAA na stonkovom vrchole. Transport je nepolárny. Regulačná funkcia cytokinínov sa prejavuje v aktivácií bunkového delenia a v niektorých prípadoch predlžovacieho rastu. Ďalej v porušení dormancie semien a v apikálnej dominancii (Hudák et al., 1991).

Vysoké koncentrácie cytokinínov indukujú tvorbu adventívnych púčikov, ale inhibujú proces rizogenézy. Medzi natívne cytokiníny patrí zeatín (4-hydroxy-3-metyl-*trans*-2-butenylaminopurín) a 2iP ( N<sup>6</sup>-(2-izopentyl) adenín). Medzi syntetické cytokiníny

používané pri kultivácii rastlinných explantátov patrí BAP (6-benzylaminopurin), kinetín označovaný ako KIN (6-furfurylamínopurin). Určité cytokinínové aktivity vykazujú aj tidiazuron (TDZ) (Salaj a Blehová, 2006).

**Giberelíny** - boli objavené pri štúdiu choroby ryže, ktorú spôsobovala huba *Giberella fujikuroi* a prejavovala sa abnormálnym predlžovacím rastom postihnutých rastlín. Zistilo sa, že tento zvýšený predlžovací rast vyvolávajú metabolické produkty huby, ktoré nazvali giberelíny. Neskôr sa zistilo, že giberelíny sa nachádzajú nielen v uvedenej hube, ale aj vo vyšších rastlinách (Erdelský a Frič, 1979).

Dnes je známych približne 90 rôznych molekúl, ktoré majú štruktúru giberelínu. Podľa štruktúry môžeme giberelíny rozdeliť do dvoch skupín:

1. giberelíny s 19 atómami uhlíka (C<sub>19</sub> giberelíny),
2. giberelíny s 20 atómami uhlíka (C<sub>20</sub> giberelíny) (Hrubíková et al., 2009).

Fyziologické účinky giberelínov:

- Stimulujú predlžovací rast mnohých druhov intaktných rastlín, špeciálne rast zakrpatených rastlín, ale tiež rastlín dvojročných, najmä vo fáze prízemnej ružice.
- Stimulujú klíčenie semien druhov, ktorých klíčenie je závislé na svetle.
- Prerušujú odpočinok semien a púčikov.
- Indukujú syntézu enzýmov v klíčiach semenách.
- Urýchľujú kvitnutie a indukujú kvitnutie druhov, vyžadujúcich jarovizáciu, ak vegetujú v neinduktívnych podmienkach.
- Ovplyvňujú mobilizáciu asimilátov a minerálnych živín v zásobných orgánoch.
- Stimulujú konverziu organických látok (Zima et al., 2002).

Niektoré údaje potvrdzujú, že účinok giberelínov sa prejavuje na zmenách dedičných vlastností niektorých rastlín, pretože vplývajú na orgány buniek (Pastýrik, 1979).

Najčastejšie použitie giberelínov v explantátových kultúrach je pri regenerácii rastlín. Kyselina giberelová je nevyhnutná pre meristémové kultúry niektorých druhov. Pozitívne ovplyvňuje ich integritu a urýchľuje tvorbu a rast výhonkov z meristémových kultúr. Vo všeobecnosti, giberelíny navodzujú predlžovací rast internódii a rast meristémov alebo púčikov *in vitro*. Zvyčajne inhibujú tvorbu adventívnych koreňov, ako aj rast výhonkov (Hrubíková et al., 2009).

Kyselina abscisová (ABA) bola izolovaná v 60-tych rokoch, ale svoje pomenovanie dostala neskôr. Vo všeobecnosti sa považuje za inhibítor rastových a morfogénnych procesov. Vo vyšších rastlinách sa vyskytuje vo veľmi nízkych koncentráciách.

Kyselina abscisová je pätnásť uhlíkatý sesquiterpén, ktorého prekursorom je kyselina mevalónová (Zima et al, 2002)

Hlavnými funkciami kyseliny abscisovej sú: opadávanie listov a plodov, brzdenie predĺžovacieho rastu, dormancia hlúz, púčikov, semien, urýchlenie starnutia, zníženie transpirácie uzavretím prieduchov (Erdelský a Frič, 1979). Prítomnosť kyseliny abscisovej v kultivačných médiách podporuje normálny vývin izolovaných zygotových embryí, regeneráciu koreňov, založenie štruktúr apikálneho meristému, meristematickú determináciu apikálnych buniek (Hrubíková et al. , 2009).

Ďalšími rastovými regulátormi sú: etylén, oligosacharidy, polyamíny a fenoly.

#### **1.6.4 Poznatky o produkcii druhov rodu *Vaccinium* prostredníctvom adventívnej organogenézy**

Adventívna organogenéza je osobitým morfogénnym prejavom v kultúre *in vitro* a typom organogenézy. Reprodukcia rastlín pomocou adventívnej organogenézy je menej používanou technikou napriek tomu, že efektívnosť reprodukcie je vysoká. Proces predstavuje vznik orgánov *de novo*, ktoré neboli prítomné v explantáte. Sú považované za prídavné – adventívne orgány.

Adventívne púčiky a výhony môžu sa vytvoriť kultiváciou rôznych explantátov, napr. na hypokotyloch semenáčikov z buniek primárnej kôry a lyka, na listoch alebo na listových stopkách, na kvetných stopkách, na stonkách, na kľúčnych listoch nezrelých alebo zrelých embryí. Môžu sa vytvoriť na orgánoch, ktoré sa nepoužívajú na vegetatívne rozmnožovanie, napr. aj na ihliciach ihličnatých drevín. Okrem iných faktorov pre úspešnú indukciu adventívnej organogenézy na spomínaných explantátoch je dôležitý obsah rastových látok v kultivačnom médiu. Pri niektorých rastlinných druhoch je dôležitý zvýšený obsah cytokinínov v kultivačnom médiu, pri iných obsah cytokinínov v kombinácii s auxínmi. Adventívne výhony sa môžu diferencovať nepriamo (z kalusového pletiva) alebo priamo na explantáte.

Na Slovensku sa problematike adventívnej organogenézy venujú pracovníci Ústave genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre (Gajdošová et al., 2004; Gajdošová et al., 2006; Gajdošová et al., 2007 a, b; Ondrušková a Ostrolucká, 2006; Ostrolucká et al., 2007).

V zahraničí sa viacerí autori zaoberajú indukciou adventívnej organogenézy pri rôznych rastlinných druhoch, tiež ovocných druhoch, napr. *Rubus* a *Malus* (Shwartz et al. 1990), *Prunus domestica* L. (Nowak a Miczyński, 2002) a pod.. Regenerácia touto technikou bola dosiahnutá aj pri odrodách druhu *Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L. (Marcotrigiano et al, 1996; Shibli a Smith, 1996; Debnath and McRae, 2002; Debnath, 2003; Debnath, 2005c; Meiners et al., 2007). Ako primárne explantáty sa využívajú prevažne pletivá listov, ktoré sa vyznačujú dobrou morfogénnou kompetenciou v smere adventívnej organogenézy. Listy izolované z mikrovýhonkov sú zvlášť výhodnými explantátmi.

Shibli a Smith (1996) indukovali priamu organogenézu z listov pri druhu *Vaccinium pahalae* Skotts., ale aj hypokotylových explantátoch pri *V. myrtilus* L. Podobne Debnath, (2003) sa zamerával regeneráciou výhonkov adventívnou organogenézou z hypokotylových segmentov - z apikálnej, centrálnej a bazálnej časti hypokotylu pri odrodách 'Ida', 'Splendor', 'Erntesegen' druhu *Vaccinium vitis-idaea* L.

Debnath a McRae (2002) uskutočnil tri experimenty pri odrodách 'Regal', 'Splendor', 'ECL1' brusnice obyčajnej (*Vaccinium vitis-idaea* L.). Na indukciu adventívnej organogenézy bolo použité ako základné médium (modifikované MS médium) a autormi vytvorené kultivačné médium. Prvý experiment sa zaoberal účinkom koncentrácie zeatínu a významom orientácie listov (abaxiálna a adaxiálna strana) na médiu na adventívnu regeneráciu všetkých troch odrôd. Listové explantáty každej odrody boli umiestnené na použité médium s obsahom zeatínu v rôznych koncentráciách (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ). Pri všetkých odrodách nastala tvorba výhonkov, ale najväčšiu tvorbu výhonkov autori zaznamenali pri odrode 'Regal' na adaxiálnej strane listu. Podstatou druhého experimentu bolo zhodnotiť, ktorý typ a koncentrácia cytokinínu a tiež účinok listovej polarita najlepšie vplýva na tvorbu výhonkov pri odrode 'ECL1'. Bol testovaný cytokinín zeatín (5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{M}$ ), TDZ (0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) a 2iP (25  $\mu\text{M}$ ). Najväčšia tvorba adventívnych výhonkov bola zaznamenaná na zeatíne pri koncentrácii 20  $\mu\text{M}$ . Cytokinín TDZ spôsobil nadmernú produkciu kalusov a brzdil predlžovanie výhonkov. Tretí experiment bol zameraný na sledovanie

účinku kultivačného média a dvoch typov listov na tvorbu výhonkov. Ako primárne explantáty boli použité listy (mladšie a staršie), média BM-A, BM-D, ktoré predstavujú vlastné modifikované médium (Debnath a McRae, 2002) pri dvoch odrodách 'Erntedank' a 'ECL1'. Spomedzi dvoch stanovených médií bolo úspešnejšie BM-D. Mladé listy, umiestnené spodnou stranou na médium v prvých siedmich dňoch udržiavané v tme, dosahovali lepšiu regeneráciu. Odroda 'Erntedank' bol úspešnejšia ako klon 'ECL1'.

Ako už z uvedeného vyplýva Debnath uskutočnil sériu pokusov zameraných na adventívnu organogézu pri rôznych odrodách. Pri ďalšom pokuse Debnath (2005c) sledoval účinok rôznych koncentrácií (0, 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) TDZ a súčasne orientáciu listov (abaxiálna a adaxiálna strana listu) pri odrode 'Erntedank' druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. Východiskový materiál bol odobratý s proliferovaných výhonkov predtým založenej kultúry. Výsledok experimentu potvrdil pozitívny účinok TDZ na tvorbu adventívnych výhonov, pričom najlepšie koncentrácie boli 1  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Na abaxiálnej strane listu nastala menšia tvorba adventívnych výhonkov. Druhý experiment bol zameraný na účinok TDZ a zeatínu z hľadiska vplyvu na predlžovanie výhonkov. Výsledky potvrdili, že zeatín podporuje predlžovanie výhonkov a TDZ má negatívny vplyv na predlžovanie.

Celkove z pokusov vyplýva, že z cytokinínov viac efektívne pôsobil zeatín v porovnaní s TDZ a 2iP. Proliférácia výhonkov bola výrazne ovplyvnená orientáciou explantátov a taktiež genotypy reagovali odlišne s ohľadom na schopnosť tvorby adventívnych výhonkov.

Ďalšie porovnanie rastových regulátorov za účelom iniciácie adventívnych výhonkov z listových explantátov odrody 'Red Pearl' brusnice obyčajnej (*Vaccinium vitis-idaea* L.) a odrody 'Ozarkblue' brusnice chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) uskutočnili Meiners et al. (2007).

Uvedení autori použili nodálne segmenty ako primárne explantáty na iniciáciu tvorby výhonkov pri odrode 'Red Pearl' a 'Ozarkblue'. Rozličné rastové regulátory testovali na optimalizáciu indukcie adventívnych výhonkov z mikropropagovaných výhonkov pri oboch odrodách. Testovali vplyv cytokinínu TDZ, zeatín a meta-topolin v rôznych koncentráciách. Efekt regenerácie hodnotili na základe počtu výhonkov na explantát. Výsledky potvrdili, že zeatín (v koncentrácii 20 $\mu\text{M}$ ) pri oboch odrodách

vykazoval vyššiu indukciu výhonkov ako TDZ a meta-topolin. V prípade odrody 'Red Pearl' s doplnením média 1  $\mu$ M NAA. Vo svojej práci sa zaoberali aj porovnaním auxínov (IBA a NAA) za účelom určiť, ktorý je vhodnejší na zakorenenie odrody 'Red Pearl'. Do zakoreňovacieho média pridali auxíny IBA a NAA v rôznych koncentráciách. Testom zistili, že IBA je vhodnejšia ako NAA.

Meiners et al. (2007) vypracovali protokol úspešnej regenerácie listových explantátov druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. a *Vaccinium corymbosum* L. za účelom vhodnosti pre efektívnu mikropropagáciu, ako aj vývin transgénnych rastlín.

Výsledky pokusov viacerých autorov potvrdzujú, že adventívna organogéza je významným a dôležitým regeneračným systémom nielen z hľadiska efektívnej mikropropagácie, ale aj genetických transformácií.

## **1.7 Súčasný stav riešenia problematiky transformácií pri drobnom ovocí a ich význam**

McNicol a Graham (1990) popisujú výhody genetického inžinierstva pre rýchle získanie rastlín so žiadanými, hospodársky významnými agronomickými vlastnosťami. Genetické transformácie drobného ovocia sa uskutočňujú za rôznym účelom, napr. zlepšenia jeho kvality, odolnosti voči hubovým a vírusovým ochoreniam, ku chladu, vývinu partenokarpických plodov a pod.. Debnath a da Silva (2007) uvádzajú vo svojej práci účel genetických transformácií pri jahodách. Prenesený gén by mal zlepšiť odolnosť voči škodcom, herbicídom a toleranciu k chladu. Serres et al. (1997) popisujú úspešnosť genetickej transformácie pri brusniciach, ktorá bola uskutočnená za účelom rezistencie voči hmyzu a tolerancie k herbicídom.

Od prvého pokusu so zameraním na genetické transformácie rastlín (na prelome sedemdesiatych a osemdesiatych rokov) sa vyvinulo množstvo, najmä priamych techník genetickej transformácie rastlín. V súčasnosti najpoužívanejšou technikou je genetická transformácia prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* (Salaj a Blehová, 2006). T-DNA Ti plazmida *Agrobacterium tumefaciens* sa používa na prenos cudzorodných génov do genómu jadra bunky rastlín. Ti plazmid pre svoju veľkosť, schopnosť navodiť tvorbu nádorov a neprítomnosť jedinečných reštrikčných miest, nie je vhodný na jeho



priame využitie pre genetické transformácie. Na genetické transformácie pomocou T-DNA sa používajú dva systémy vektorov DNA odvodené od Ti plazmidu - integrované vektory a dvojité (binárne) vektory. Obidva vektory DNA využívajú skutočnosť, že gény pre syntézu hormónov a opínov nie sú potrebné pre prenos a vir gény sú mimo T-DNA v Ti plazmide. T-DNA, ktorá nesie onkogény je nahrádzaná sekvenciami cudzieho génu a Ti plazmid sa obohacuje o poradie nukleotidov pre pôsobenie reštrikčných enzýmov (Bežo et al., 2005).

Genetická transformácia prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* sa využíva aj pri *Vaccinium spp.*. Viacerí autori venujú pozornosť problematike transformácií pri rode *Vaccinium* (Cao et 1998, Graham et al. 1996, Meiners et al., 2007, Serres et al. 1997, Song a Sink 2004).

Touto problematikou sa zaoberali aj Graham et al. (1996) použitím kmeňa LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* obsahujúceho binárny vektor s cieľovým GUS génom. Explantáty museli po inkubácií ošetriť namáčaním do antibiotík a následným premytím v sterilnej destilovanej vode. Klíčiace rastliny boli po regenerácii prenesené na médium s obsahom antibiotika ticarcillinom na dvanásť týždňov. Cieľom bolo eliminovať zvyšné baktérie (*Agrobacterium tumefaciens*). Výber regenerujúcich explantátov s prejavom génu GUS dosiahli pestovaním rastlín dva dni na médiu s MUG a skúmali ho pod UV svetlom. To bolo potrebné na zistenie fluorescenčnej aktivity.

Pri tomto štúdiu bolo zisťovaných viac faktorov, vplývajúcich na účinok spôsobu prenosu génu *gusAint* pomocou *Agrobacterium tumefaciens* do buniek pletiva listov viacerých a komerčne známych odrôd druhu *Vaccinium corymbosum* L. ('Berkeley', 'Bluecrop', 'Duke', 'Elliott', 'Jersey', 'Sierra', 'Sunrise', 'Toro', 'Georgiagem', 'Reveille'), taktiež do kalusu odvodeného z týchto buniek počas skorých fáz transformácie. Použité boli dva kmene *Agrobacterium tumefaciens* - EHA 105 a LBA4404. Viac efektívny kmeň pre danú transformáciu bol EHA 105 (Cao et al., 1998).

Ďalšie poznatky poukazujú na účinnú tvorbu výhonkov metódou a na výsledky transformačnej štúdie vedenej spôsobom stabilizovanej transformácie pomocou *Agrobacterium tumefaciens* na štyroch vybraných odrodách 'Aurora', 'Bluecrop', 'Brigitta' a 'Legacy' druhu *Vaccinium corymbosum* L. . Kmeň EHA 105 (*Agrobacterium tumefaciens*) bol pri tomto experimente najviac efektívny zo všetkých troch použitých (LBA4404, GV3101) (Song a Sink, 2004).

Genetická transformácia drobného ovocia rodu *Rubus*, *Fragaria*, *Ribes* je dokázateľne problematická, pretože ťažkosti v rozvoji systémov účinku na regeneráciu výhonku sú neskôr nevyhnutnou podmienkou úspešnej transformácie. Vývoj rastlinných regeneračných systémov smeruje k tomu, aby bolo veľa vytvorených genotypov, a tak je nepriamo použiteľný aj na ďalšie odrody (Graham et al., 1995).

## **1.8 Vplyv antibiotík na adventívnu regeneráciu rastlín s cieľom ich použitia pri genetických transformáciách**

Mnohé štúdie sa zaoberajú vplyvom antibiotík na adventívnu regeneráciu rastlín za účelom detekcie a selekcie transformovaných buniek a tiež eliminácie *Agrobacterium tumefaciens* z kultúry *in vitro* po transformácii (Nauerby et al., 1997; Bau a Wakhlu, 2001; Tang a Luo, 2002; Tang et al., 2003; Deepinder et al., 2006; Wenhao a Castillo, 2007; Meiners et al., 2007 a iní).

Rezistencia rastlín voči antibiotikám je prevažne testovaná kultiváciou listových explantátov na kultivačných médiách s obsahom antibiotík a hodnotením vplyvu antibiotík na ich regeneračný potenciál.

Nauerby et al. (1997) porovnávali vplyv rôznych koncentrácií antibiotík – timentínu ( $150 \text{ mg.l}^{-1}$ ), carbencilínu ( $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a cefotaxímu ( $500 \text{ mg.l}^{-1}$ ) na regeneráciu pletiva listov a klíčnych listov (kotyledonov), na produkciu výhonkov, proces rizogenézy a vhodnosť pre elimináciu *Agrobacterium tumefaciens*. Autori uvádzajú, že vplyv timentínu bol bezvýznamný alebo pozitívny, ak ho porovnáme carbencilínom a cefotaxímom.

Účinok viacerých antibiotík (carbencilín, chloramphenicol, cefotaxím, kanamycín a hygromicín) na morfogénnu reakciu kalusu druhu *Coryphata elephantidens* študovali Bhau a Wakhlu (2001). Tang a Luo (2002) sledovali vplyv troch antibiotík – carbencilínu, claforanu a timentínu - na tvorbu a rast kalusu z embryí a tiež na diferenciáciu adventívnych výhonkov z kalusu. Autori zaznamenali stimulačný vplyv všetkých troch antibiotík v porovnaní s kontrolou (médiom bez antibiotík), ktorý sa prejavil zvýšenou tvorbou kalusu a zvýšenou diferenciáciou adventívnych výhonkov s rozdielnym efektom v intenzite pôsobenia jednotlivých antibiotík. Maximálny

priemerný počet regenerovaných adventívnych výhonkov z organogénneho kalusu bol zaznamenaný pri timentíne a minimálny pri carbenicilíne. Následne priaznivý účinok uvedených antibiotík na regeneráciu poukazuje na spoľahlivosť ich využitia pri genetických transformáciách druhu *Pinus taeda* L. a iných druhoch.

V ďalšom experimente Tang et al. (2003) rozšírili testovanie antibiotík. Testovali ampicilín a cefotaxím okrem carbenicilínu. Hodnotili vplyv uvedených antibiotík na indukciu, rast a diferenciáciu organogénneho kalusu, ako aj na zakoreňovanie regenerovaných výhonkov pri druhu *Pinus taeda* L. Cefotaxím maximálne zvyšoval formovanie a rýchlosť rastu organogénneho kalusu, ale minimálne zvyšoval frekvenciu regenerácie výhonkov. Carbenicilín na rozdiel od predchádzajúceho pokusu maximálne zvýšil regeneráciu adventívnych výhonkov z organogénneho kalusu a minimálne znižoval frekvenciu zakorenenia výhonkov pri troch testovaných genotypoch. Ampicilín maximálne znižoval frekvenciu zakorenenia adventívnych výhonkov a priemerný počet koreňov na regenerovaný výhonok v porovnaní s kontrolou (médium bez antibiotík). Celkove všetky tri antibiotiká stimulovali formovanie kalusu a regeneráciu výhonkov a redukovali tvorbu koreňov regenerovaných výhonkov. Autori uvádzajú, že výsledky budú použité pre optimalizáciu genetických transformácií pri ihličnatých drevinách.

Wenhao a Castillo (2007) sa zamerali na vplyv rôznych faktorov na regeneráciu výhonkov z pletiva listov pri druhu *Buddleia*, v rámci ktorých testovali aj účinok antibiotík. Podobne ako predchádzajúci autori uvádzajú, že carbenicilín (v koncentrácii od 250 – 500 mg.l) a cefotaxím (od 125 – 250 mg.l) jednotlivo a aj kombinovane pôsobia pozitívne na regeneráciu výhonkov z pletiva listov. Ďalší autori (Deepinder et al., 2006) sa zaoberali účinku cefotaxímu (100 mg.l) na somatickú embryogenézu a regeneráciu rastlín pri ryži.

## 2. CIEĽ PRÁCE

Adventívna organogenéza je významným a účinným regeneračným systémom z hľadiska efektívnej produkcie rastlín a plánovaných genetických transformácií, ktoré sú predmetom záujmu za účelom produkcie drobného ovocia s požadovanými úžitkovými vlastnosťami a rezistenciou voči biotickým a abiotickým faktorom. Efektívnosť genetickej transformácie je limitovaná a závislá na úspešnej regenerácii celistvých rastlín z transformovaných buniek. Antibiotiká aplikované do kultivačných médií umožňujú selekciu transformovaných buniek po genetickej transformácii.

Poznatky týchto experimentov budú využité pri genetických transformáciách, ktorých uskutočnenie je plánované v najbližšom období na Ústave genetiky a biotechnológií rastlín v Nitre.

Na základe uvedeného cieľom práce bolo :

- \* Indukovať proces adventívnej organogenézy pri vybraných druhoch rodu *Vaccinium* a jej prostredníctvom dosiahnuť rýchlu a efektívnu proliferáciu výhonkov - produkciu veľkého počtu rastlín.
- \* Overiť a zhodnotiť reakciu pletív na selekčné antibiotiká (kanamycín, hygromycín), používané pri genetických transformáciách a antibiotika cefotaximu, používaného pre elimináciu *Agrobacterium* sp., a to ich aplikovaním do kultivačného média v rôznych koncentráciách.
- \* Na základe prežívania explantátov stanoviť typ a koncentráciu antibiotík, vhodných pre aplikáciu do kultivačného média pre plánovanú selekciu transformovaných buniek.

Je dôležité zistiť optimálnu koncentráciu testovaného antibiotika, ktorá inhibične pôsobí na netransformované bunky, na ich delenie a rast, ktoré sú eliminované, ale nie je toxická pre transformované bunky. Transformované bunky, ktoré obsahujú gén rezistencie k danému antibiotiku, môžu sa ďalej deliť a rásť. Pri antibiotiku cefotaxim bolo potrebné zistiť koncentráciu, ktorá nie je toxická pre bunky a pletivá *Vaccinium* sp., ale ktorá potlačí rast *Agrobacterium tumefaciens*.

## **3. MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1 Východiskový materiál**

Východiskové rastliny, použité na izoláciu primárnych explantátov, boli dopestované na pokusných plochách VÚTPHP (Výskumného ústavu trávnych porastov a horského poľnohospodárstva v Banskej Bystrici) - na Výskumnej stanici v Krivej. Východiskový materiál bol odobratý na pokusných plochách koncom februára.

V diplomovej práci sme sa pokúsili o regeneráciu a reprodukciu prostredníctvom adventívnej organogenézy pri introdukovanej odrode 'Berkeley' druhu brusnice chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) a odrodách 'Linnea', 'Ida', 'Red pearl' druhu brusnice obyčajnej (*Vaccinium vitis-idaea* L.)

### **3.2 Založenie kultúry púčikov**

Nodálne segmenty s púčikmi a rastové vrcholy sme použili ako primárne explantáty, z ktorých sme odvodili výhonky.

### **3.3 Sterilizácia prostredia a biologického materiálu**

Základným predpokladom práce s pletivovými kultúrami je aseptické prostredie. Jednotlivé manipulácie sa uskutočňujú v laminárnych boxoch, s vysterilizovaným pracovným náradím, laboratórnym sklom a biologickým materiálom. Aseptické podmienky je potrebné dodržiavať počas celého obdobia kultivácie *in vitro*.

Sterilizácia segmentov stoniek s apikálnymi a axilárnymi púčikmi bola uskutočnená nasledovne: Dve hodiny sú premývané pod tečúcou vodou s pridaním pár kvapiek Tweenu, nasleduje sterilizácia 70 % etanolom (2 minúty), potom premytie sterilnou destilovanou vodou, po ktorom explantáty sú sterilizované 0,1 % roztoku HgCl<sub>2</sub> (4-5 minút). Sterilizačný roztok sa odstráni premytím explantátov 3x v sterilnej destilovanej vode. Pred založením kultúry púčikov odstránime z púčikov krycie šupiny.

### **3.4 Listové explantáty pre indukciu adventívnej organogenézy**

Za účelom odvodenia adventívnej organogenézy sme použili listy z výhonkov, odvodených *in vitro* ( vid' 3.2). Listy sme izolovali tak, aby neobsahovali listové stopky, na báze ktorých by sa mohli vyskytovať adventívne púčiky. Pletivo listovej čepele sme narušili priečnymi rezmi skalpelom a na kultivačné médium položili adaxiálnou (spodnou) stranou listu. Sterilné Petriho misky boli uzatvorené parafilmom. Po 4 - 5 týždňoch kultivácie boli preložené na čerstvé médium s rovnakým obsahom cytokinínov. Po vytvorení masy výhonov sme ich preložili do kultivačných nádob, aby sme zabezpečili priestor pre ich rast.

### **3.5 Kultivačné médiá a podmienky kultivácie**

Na kultiváciu explantátov sme použili ako základné kultivačné médium podľa Lloyda a McCowna (WPM) (1980) (komerčne distribuované firmou Duchefa). Chemické zloženie je uvedené v tabuľke. Po odvážení sme predpísané množstvo základného kultivačného média nasypali do odmerného valca s redestilovanou vodou a doplnili sacharózou (3%). Médium bolo spevnené agarom (SIGMA Chemical Co., USA) v koncentrácii 8 g.l<sup>-1</sup>.

**Tab. 2 Základné kultivačné médium WPM podľa Lloyd a McCowna (1980)**

<b>Makroelementy</b>	<b>Koncentrácia ( mg. l<sup>-1</sup> )</b>	<b>Koncentrácia ( mM - μM )</b>
CaCl <sub>2</sub>	72.50	0.65 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	471.26	2.35 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.25 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990.00	5.68 mM
MgSO <sub>4</sub>	180.54	1.50 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400.00	5.00 mM
<b>Mikroelementy</b>		
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.25	1.00 μM
FeNaEDTA	36.70	0.10 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	0.10 mM
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	22.30	0.13 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.25	1.03 μM
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8.60	29.91 μM
<b>Vitamíny</b>		
glycín	2.00	26.64 μM
myo - inositol	100.00	0.56 mM
kys. nikotínová	0.50	4.06 μM
pyridoxín - HCL	0.50	2.43 μM
thiamín - HCL	1.00	2.96 μM

Hodnotu pH média sme upravili na hodnotu 4,5 – 4,8. Hodnota pH média sa upravuje pridaním 1M roztokom HCl (pre zníženie pH) alebo 1M roztokom NaOH (pre zvýšenie pH). Na meranie pH sme použili digitálny pH meter. Po úprave hodnoty pH sme do banky pridali potrebné množstvo agaru ( 8g.l<sup>-1</sup>), ktorý sme rozpustili v mikrovlnnej rúre.

Takto pripravené základné kultivačné médium sterilizujeme sa v autokláve pri teplote 125°C a tlaku 125 kPa asi 30 - 40 min.

V závislosti od experimentu boli do základného kultivačné médiá doplnené

rôznymi koncentraciami cytokinínmi (zeatín, TDZ). Cytokinín zeatín pridáme do vopred vysterilizovaného kultivačného média (po vyautoklávovaní), cez membránový sterilný filter po jeho vychladnutí na teplotu 37°C, pretože sa jedná o termolabilnú rastovú látku.

Takto pripravené médium v sterilnom boxe rozlievame do vopred pripravených veľkých plastových sterilných Petriho misiek (s obsahom média 25 ml). V každom variante bolo testovaných 30 - 100 explantátov (listových čepelí).

Explantáty sme kultivovali v kultivačnej miestnosti pri teplote  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  a bielom fluorescenčnom osvetlení s intenzitou  $50 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a fotoperiódou 16/8 (16 hodín svetlo, 8 hodín tma). Reakciu explantátov sme sledovali v priebehu troch subkultivácií. Pri každej subkultivácii sme zaznamenali počet prežívajúcich explantátov.

### 3.6 Vplyv cytokinínov na indukciu procesu adventívnej organogenézy

Na indukcii adventívnej organogenézy sme použili ako primárny explantát listy izolované z výhonkov odvodených *in vitro* pri odrode 'Berkeley' druhu *Vaccinium corymbosum* L. a odrodách 'Linnea', 'Ida', 'Red Pearl' druhu *Vaccinium vitis-idaea* L.. Listy sme na médium uložili adaxiálnou stranou, po narušení pletiva priečnym rezom.

1. Testovanie zeatínu a TDZ pri odrode 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida' (tab. 2):

\* Kultivačné médium WPM s obsahom zeatínu v koncentráciách  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $4,4 \text{ mg.l}^{-1}$ .

\* Kultivačné médium WPM s obsahom TDZ (thidiazuronu - N-fenyl-N'-1,2,3-tidiazol - 5 - močovina) v koncentráciách  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $4,4 \text{ mg.l}^{-1}$ .

2. Testovanie TDZ v rôznych koncentráciách pri odrode 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida', 'Red Pearl' (tab. 3 - 7):

Testovanie WPM kultivačného média s obsahom TDZ (thidiazuronu - N-fenyl-N'-1,2,3-tidiazol - 5 - močovina) v koncentráciách 0,55 - 1,1 - 2,2 - 4,4 - 5,5  $\text{mg.l}^{-1}$



pri odrodách 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida' a 'Red Pearl'.

Vplyv TDZ sme hodnotili na základe percenta prežívajúcich listov pri jednotlivých subkultiváciách. Pri odrode 'Berkeley' sme hodnotenie uskutočnili v priebehu piatich subkultivácií a pri odrodách 'Linnea', 'Ida' a 'Red Pearl' po prvej a druhej subkultivácií. Časový interval medzi subkultiváciami predstavoval 4-5 týždňov. Nekrotické a kontaminované explantáty sme pri každej subkultivácii odstránili.

Pri odrode 'Berkeley' sme hodnotili okrem percenta prežívajúcich listov po V. subkultivácií aj počet výhonkov na explantát. Do počtu výhonkov sme započítali výhonky, ktoré dosahovali 2 mm a viac.

### **3.7 Testovanie reakcie pletív listov na obsah antibiotík v kultivačnom médiu**

*Hygromycín B* – je antibiotikum používané vedcami v genetickom inžinierstve. Inhibuje rast širokého spektra eukaryotických a prokaryotických buniek, tým že manipuluje so syntézou proteínov (<http://www.hygromycin.net> [online]). Génom *hyg* kódujúcim hygromycin B fosfotransferázu je kódovaná rezistencia k tomuto antibiotiku. Je to aminoglykozid produkovaný baktériou *Streptomyces hygrosopicus* (Zalacain et al., 1986).

*Kanamycín monosulfát* – je aminoglykozidové antibiotikum s baktericídnu aktivitou proti mnohým gram-negatívnym baktériám. Vytvára ho baktéria *Streptomyces kanamyceticus*. Tvorí chyby v transkripcii genetického kódu a zabezpečuje inhibíciu syntézy proteínov (Chauvin et al., 1999). Kanamycín monosulfát je biely kryštalický prášok s charakteristickou vôňou a chuťou. Ľahko sa rozpustný vo vode (<http://lekarstwo.ru/en/preparati/kanamycinum.html> [online]).

*Cefotaxim* – bol prvým a ihneď aj mimoriadne úspešným predstaviteľom dlhej série aminotiazolylnmetoxyiminocefalosporínov. Je úplne odolný proti účinkom  $\beta$ -laktamáz baktérií, vrátane prenosných (plazmidových) TEM-laktamáz aj chromozómových (neprenosných) cefalosporínáz. Cefotaxim má 10-krát až 100-krát vyššiu účinnosť in vitro na kmene enterobakteriaceí ako cefalosporíny 1. alebo 2. generácie (Hal'ko a Krčméry, 1989). Jeho využitie je aj po genetických transformáciach,

kde sa používa na zničenie baktérií rodu *Agrobacterium* (da Silva a Fukai, 2001). Antibiotiká boli pridané do základného kultivačného média s obsahom 2,2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ. Kontrolné médium neobsahovalo antibiotiká.

Testované koncentrácií antibiotík:

\* kanamycín - 0 (K – kontrola) – 25 – 50 – 100 – 150 mg.l<sup>-1</sup>

\* hygromycín - 0 (K - kontrola) – 2,5 – 5,0 – 7,5 – 10,0 mg.l<sup>-1</sup>

\* cefotaxim - 0 (K -.kontrola) – 100 – 200 – 400 mg.l<sup>-1</sup>

Účinnosť kanamycínu a hygromycínu sme testovali na listoch odrody 'Berkeley' druhu *Vaccinium corymbosum* L. a cefotaxím aj na odrode 'Linnea' druhu *Vaccinium vitis-idaea* L.

Počet založených primárnych explantátov pre testovanie bol sto listov pri odrode 'Berkeley' a 80 listov pri odrode 'Linnea', a to pri každej koncentrácii antibiotika.

### **3.7.1 Hodnotenia reakcie pletiva listov na prítomnosť antibiotík v kultivačnom médiu**

Pri každej subkultivácii (v intervaloch dvojtýždňových) sme zaznamenali:

- *Prežívajúce explantáty* – listy, ktoré boli zelené – vitálne a v ďalších subkultiváciách mnohé preukázali schopnosť adventívnej regenerácie.
- *Nekrotické explantáty* – listy, ktoré v kultivačnom médiu zhnedli, zjavne odumierali bez akéhokoľvek morfogénneho prejavu. Nekrotické boli odstránené.
- *Kontaminované explantáty* – listy, pri ktorých sa objavila prítomnosť hubovitých, kvasinkových alebo bakteriálnych kontaminácií sme odstránili.

Hodnotenie sme uskutočnili v priebehu troch subkultivácií. Percento prežívajúcich explantátov, zaznamenané pri každej subkultivácii, je vyjadrením reakcie pletiva, jeho tolerancie k antibiotiku a je ilustrované graficky. Nekrotické a samozrejme kontaminované boli pri každej subkultivácii z pokusov vylúčené. Zaznamenali sme explantáty s tvorbou kalusu (K) a indukciu adventívnej regenerácie – tvorbu adventívnych púčikov a výhonkov (B).

V prípade indukcie adventívnych púčikov a výhonkov po III. subkultivácii sme

uskutočnili transfer explantátov na WPM médium s obsahom  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  zeatínu.

Explantáty s prejavom regenerácie – indukcie tvorby adventívnych púčikov až výhonkov boli prenesené na WPM kultivačné médium s obsahom  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  za účelom stimulácie ďalšieho vývinu a rastu výhonkov. Boli pasážované po 4 týždňoch kultivácie.

## 4 VÝSLEDKY PRÁCE

### 4.1 Testovanie vplyvu rôznych koncentrácií cytokinínov (TDZ, zeatín) na regeneráciu listov odrôd `Berkeley`, `Linnea`, `Ida` a `Red Pearl`

Z mnohých poznatkov vyplýva, že na charakter morfogénnej reakcie buniek a pletív v kultúre *in vitro* významne vplýva zloženie kultivačného média, zvlášť rastové látky. V experimentoch zameraných na indukciu adventívnej organogenézy sme uskutočnili testovanie vplyvu dvoch koncentrácií cytokinínov – TDZ a zeatínu - za účelom zistenia ich vplyvu na indukciu adventívnych výhonkov. Výsledky experimentov môžu prispieť k optimalizácii podmienok indukcie procesu adventívnej organogenézy.

1. Testovanie zeatínu a TDZ pri odrode `Berkeley`, `Linnea`, `Ida` :

**Tab. 3** Morfogénna reakcia pletív listov na médiu WPM s obsah cytokinínov

Odroda	PPE	Listy															
		Zeatín								TDZ							
		2,2 mg.l <sup>-1</sup>				4,4 mg.l <sup>-1</sup>				2,2 mg.l <sup>-1</sup>				4,4 mg.l <sup>-1</sup>			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
`Berkeley`	30	67		33		27		23	50	33	17	50		57		43	
`Linnea`	30			100		17		83		37	13	50		87	6,5	6,5	
`Ida`	30			50	50				100	40		10	50	83		17	

Vysvetlivky: PPE – počet primárnych explantátov, A – tvorba kalusu, B – indukcia adventívnej organogenézy, C – nekróza, D – kontaminácia.

A, B, C, D – (v %).

## *Zeatín*

Z experimentu vyplýva, že listové explantáty reagovali na zeatín len diferenciáciou kalusového pletiva. Najvyššia tvorba kalusu nastala pri odrode `Berkeley`. Tabuľka 3 ilustruje, že až 67 % listov reagovalo tvorbou kalusu pri nižšej koncentrácii zeatínu ( $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ), kým pri koncentrácii  $4,4 \text{ mg.l}^{-1}$  nastala tvorba kalusu len pri 27 % listov. Pletivo listov odrody `Linnea` reagovalo na obsah zeatínu 83 – 100 % nektrózou a len pri 17 % listov nastala tvorba kalusu. Listy odrody `Ida` zněkrotizovali alebo úplne skontaminovali, čo značne ovplyvnilo a obmedzilo prejav regeneračnej schopnosti tejto odrody. Príčinou kontaminácie mohlo byť viac faktorov. Opakovanie experimentu nebolo možné uskutočniť z časového dôvodu. Zeatín nepreukázal pozitívny vplyv na indukciu adventívnej organogenézy pri testovaných odrodách..

## *TDZ*

Odrody `Berkeley` a `Linnea` reagovali na prítomnosť zeatínu v médiu len tvorbou kalusu, kým cytokinín TDZ pôsobil efektnejšie. Na médiu s obsahom TDZ sme dosiahli aj indukciu a proliferáciu adventívnych výhonkov. Výsledky ukázali, že pozitívnejšie pôsobila nižšia koncentrácia TDZ ( $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) pri odrode `Berkeley`, ako aj pri odrode `Linnea`. Pri odrode `Berkeley` nastala na jednej tretine listov tvorba kalusu a približne na jednej šestine listov aj indukcia adventívnej organogenézy. Pri odrode `Berkeley` nastala indukcia adventívnej organogenézy len pri nižšej koncentrácii TDZ, kým pri odrode `Linnea` aj pri vyššej koncentrácii TDZ ( $4,4 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Odroda `Linnea` sa javí úspešnejšia z hľadiska indukcie adventívnej organogenézy. Pozitívne na indukciu a proliferáciu adventívnych výhonkov pri tejto odrode pôsobilo médium s obsahom TDZ. Pri odrode `Ida` nastala pri oboch koncentráciách len tvorba kalusu (40-83 %). Viac ako  $\frac{3}{4}$  listov tvorilo kalus. Na žiadnom liste sme nezaznamenali indukciu adventívnej organogenézy. Regeneračný potenciál odrody `Ida` mohol ovplyvniť do značnej miery negatívne výskyt kontaminácie (tab. 3).

Z výsledkov vyplýva, že indukciu adventívnych výhonkov sa podarilo dosiahnuť len na médiu s cytokinínom TDZ. Odroda `Ida`, ako sme uviedli, netvorila žiadne výhony. Pri odrodách `Berkeley` a `Linnea` z testovaných koncentrácií TDZ ako najefektívnejšie pôsobiaci variant sa javilo médium s  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ.

2. Testovanie rôznych koncentrácií TDZ pri odrode 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida', 'Red Pearl' (tab. 4 - 8):

Ako primárny explantát boli použité listy odrôd 'Berkeley', 'Linnea', 'Ida', 'Red Pearl', ktoré boli kultivované na kultivačnom médiu WPM s obsahom rôznych koncentrácií TDZ. Výsledky testovania cytokinínu TDZ na listoch odrody 'Berkeley' sú uvedené v tabuľke 4.

**Tab. 4 Morfogenná reakcia pletív listov na koncentrácie cytokinínu TDZ**

Odroda	Počet primárnych explantátov	Koncentrácia TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Listy									
			I.		II.		III.		IV.		V.	
			P	PPV	P	PPV	P	PPV	P	PPV	P	PPV
'Berkeley'	30	0,55	50	0	20	0	17	0	0	0	0	0
	30	1,1	100	0	60	0	60	0	47	0	47	12,8
	30	2,2	50	0	37	0	37	0	37	4,9	37	7,3
	30	4,4	30	0	27	0	27	0	10	0	10	2,4
	30	5,5	100	0	80	0	80	0	70	0	70	6,7

Vysvetlivky: I. – V. – subkultivácie,

P – prežívajúce listy v %,

PPV – priemerný počet výhonov na explantát.

Hodnotenie listov sme uskutočnili v priebehu piatich subkultivácií. Pri každej subkultivácii a koncentrácii TDZ sme zaznamenali a hodnotili prežívajúce listy. Za prežívajúce sme považovali tie listy, na ktorých sa neprejavili znaky nekrózy a na ktorých sa tvoril kalus. Kalus na listoch sa začal tvoriť po druhej a tretej subkultivácii. Indukciu adventívnej organogenézy sme zaznamenali pri štvrtej subkultivácii, ale len na médiu s TDZ v koncentrácii 2,2 mg.l<sup>-1</sup>. Pri piatej subkultivácii sme uskutočnili konečné hodnotenie úspešnosti indukcie adventívnej organogenézy. Zistili sme priemerný počet výhonkov na explantát, ktorý sa pohyboval od 2,4 do 12,8. Najväčšia proliferácia výhonkov nastala na médiu s obsahom 1,1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ, čo dokumentuje priemerný počet výhonkov na explantát (12,8). Táto koncentrácia sa ukázala ako najúspešnejšia a najvhodnejšia pre indukciu adventívnej organogenézy. Listy, ktoré znekrotizovali alebo boli kontaminované nie sú uvedené v tabuľke.

Súbežne sme testovali koncentrácie cytokinínu TDZ na listoch odrôd `Linnea`, `Ida` a `Red Pearl`. Časový úsek od založenia experimentu po prvú subkultiváciu a medzi jednotlivými subkultiváciami bol 4 - 5 týždňov. Výsledky hodnotenia testovania vplyvu koncentrácií cytokinínu TDZ na listy jednotlivých odrôd zobrazujú tabuľky 4 – 6. V uvedených troch experimentoch sa nepodarilo dosiahnuť indukciu adventívnej organogenézy. Listy už po prvej subkultivácii znekrotizovali na všetkých koncentráciách média. Príčinu nevieme presne objasniť. Predpokladáme, že úplnu nekrózu listov mohla spôsobiť zvýšená teplota počas kultivácie pred druhou subkultiváciou, spôsobenou poruchou klimatizácie v kultivačnej miestnosti. Nemali sme dostatok času na opakovanie experimentov.

**Tab. 5 Morfogénna reakcia pletív listov na koncentrácie cytokinínu TDZ**

Odroda	Počet primárnych explantátov	Koncentrácia TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Listy			
			I.		II.	
			P	PPV	P	PPV
'Linnea'	30	0,55	20	0	0	0
	30	1,1	23	0	0	0
	30	2,2	3	0	0	0
	30	4,4	17	0	0	0
	30	5,5	47	0	0	0

Vysvetlivky: I., II. – subkultivácia,

P – prežívajúce listy (v %)

PPV – priemerný počet výhonov na explantát

**Tab. 6 Morfogénna reakcia pletív listov na koncentrácie cytokinínu TDZ**

Odroda	Počet primárnych explantátov	Koncentrácia TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Listy			
			I.		II.	
			P	PPV	P	PPV
'Ida'	30	0,55	37	0	0	0
	30	1,1	33	0	0	0
	30	2,2	60	0	0	0
	30	4,4	100	0	0	0
	30	5,5	83	0	0	0

**Tab. 7 Morfogénna reakcia pletív listov na koncentrácie citokinínu TDZ**

Odroda	Počet primárnych explantátov	Koncentrácia TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Listy			
			I.		II.	
			P	PPV	P	PPV
'Red Pearl'	30	0,55	57	0	0	0
	30	1,1	80	0	0	0
	30	2,2	100	0	0	0
	30	4,4	83	0	0	0
	30	5,5	73	0	0	0

Hodnotenie percenta prežívajúcich listov pri prvej subkultivácii nasvedčuje, že odrody reagujú rozdielne. Zvlášť odroda 'Linnea', ktorá dosahovala hodnoty od 3 do 47 %. Odroda 'Ida' a 'Red Pearl' preukázali vyššiu schopnosť prežívania. Pri jednotlivých koncentráciách TDZ percento prežitia listov sa pohybovalo pri odrode 'Ida' od 33 do 100% a odroda 'Red Pearl' od 57 do 100 %, čo vytvára predpoklad pre ich úspešnú regeneráciu.

V nasledujúcom experimente sme sa zamerali na sledovanie vplyvu koncentrácií cytokinínu TDZ s rozšíreným rozsahom (tab. 8) na prežitie, prípadne na regeneračnú schopnosť listov odrody 'Ida'. Experiment nie je ukončený, a preto v tabuľke 8 sú ilustrované len výsledky po prvej subkultivácii, ktoré sú nádejné. Napriek tomu, že percento prežívajúcich listov sa pohybuje len v rozpätí 3-17 %, ale na prežívajúcich listoch bol vytvorený kalus, na ktorom sa začali diferencovať adventívne púčiky a výhony. Z hľadiska indukcie adventívnej organogenézy sa predbežne ukazuje ako najúspešnejšia koncentrácia TDZ 4,4 a 5,5 mg.l<sup>-1</sup>.



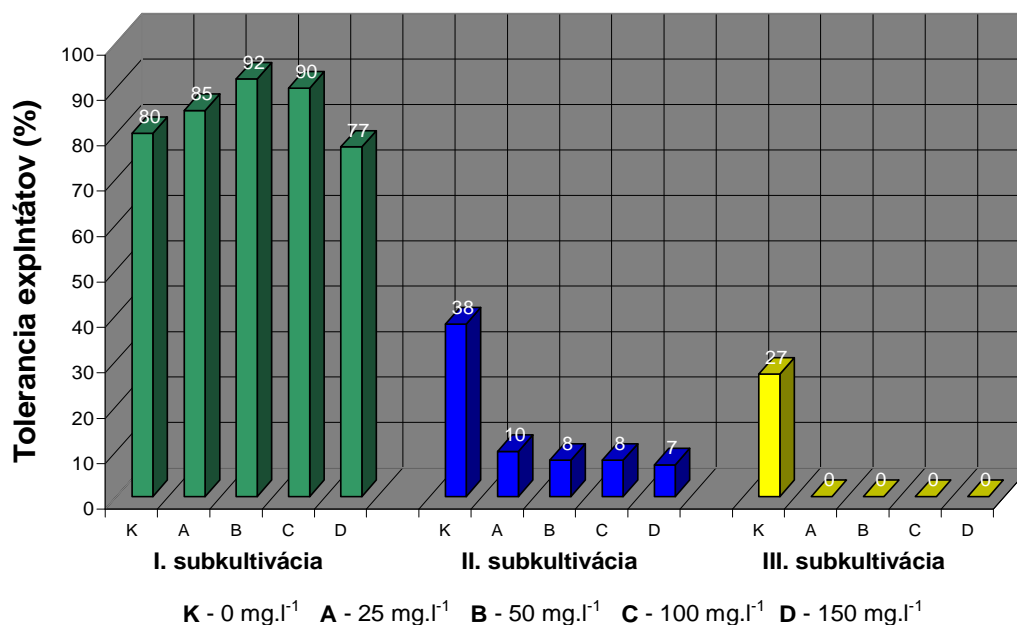
**Tab. 8 Morfogénna reakcia pletív listov na koncentrácie citokinínu TDZ**

Odroda	Počet primárnych explantátov	Koncentrácia TDZ (mg.l <sup>-1</sup> )	Listy	
			I.	
			P	PPV
'Ida'	30	0,55	0	0
	30	1,10	0	0
	30	1,65	0	0
	30	2,20	10	0
	30	3,30	3	0
	30	4,40	17	0
	30	5,50	17	0

## 4.2 Testovanie antibiotík a ich rôznych koncentrácií na listoch

### 4.2.1 Testovanie selekčných antibiotík (kanamycín, hygromycín)

V ďalších pokusoch sme sa zaoberali testovaním selekčných antibiotík (kanamycín, hygromycín), pri ktorých je dôležité poznať ich vplyv na regeneráciu pletív s perspektívou ich využitia na detekciu, selekciu transformovaných buniek a ich elimináciu. Testovali sme uvedené antibiotiká v piatich koncentráciách za účelom zistenia najvhodnejšej koncentrácie antibiotík pre odrodu `Berkeley` brusnice chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.), ktorej listy boli použité listy ako primárne explantáty. Listy sme testovali na WPM médium s obsahom 2,2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ, ktoré predstavovalo kontrolné médium a na médiách s pridaním kanamycínu a hygromycínu. Hodnotili sme percento prežívajúcich explantátov, t. j. reakciu pletiva na prítomnosť antibiotík (graf 1, 2), a to po dvoch týždňoch pri každej subkultivácii, pričom nekrotické a kontaminované listy sme samozrejme odstraňovali.



**Graf 1** Reakcia pletív listov odrody `Berkeley` a ich tolerancia na kanamycín

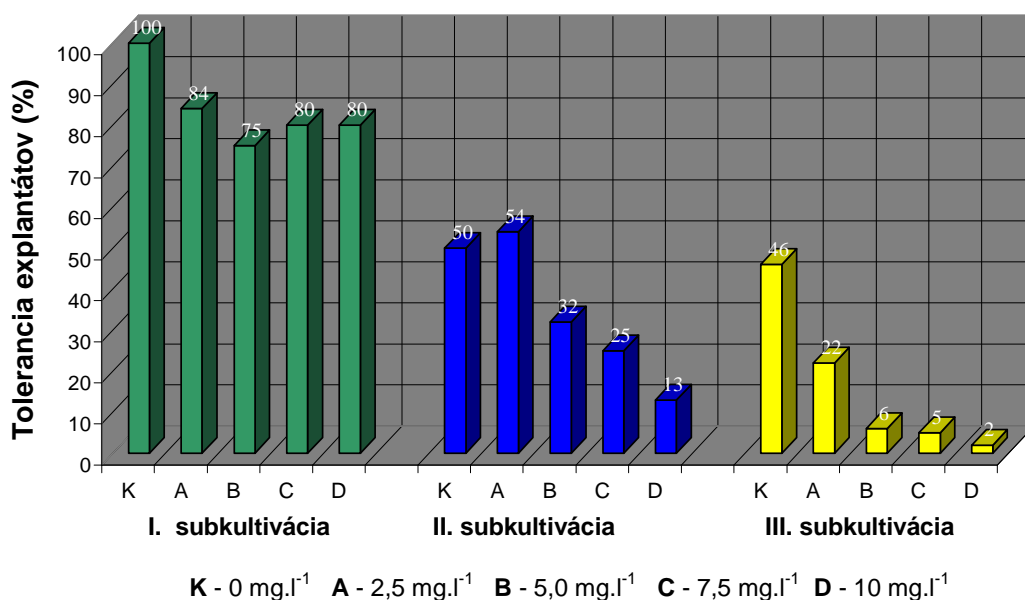
Pri prvej subkultivácii sa ukázalo, že prežívajúce pletivá listov si zachovali pôvodný vzhľad (zelené sfarbenie). Listy, ktoré sa museli z dôvodu nekrózy odstrániť tvorili minimálny počet. Percento prežívajúcich listov bolo najvyššie na médiu s 50 mg.l<sup>-1</sup> kanamycínu a dokonca vyššie ako na kontrolnom médiu. Pri druhej subkultivácii (po štyroch týždňoch) sme zaznamenali značnú nekrózu pletív listov, a to aj na kontrolnom médiu (graf 1). Napriek tomu, pokles prežívania pletív listov na všetkých koncentráciách kanamycínu na 7-10 % (v porovnaní s 38 % na kontrolnom médiu) poukazuje na jeho inhibičný účinok, ktorý preukazuje sa prejavil pri ďalšom hodnotení. Pri tretej subkultivácii (po 6 týždňoch) sa prejavila silná toxicita všetkých koncentrácií kanamycínu. Na kontrolnom médiu prežilo 27 % listov, pri ktorých sme zaznamenali aj indukciu regenerácie. Na všetkých explantátoch sa tvoril kalus a na niektorých sme pozorovali aj indukciu tvorby výhonkov.

Explantáty s tvorbou adventívnych púčikov a výhonkov sme preniesli na médium WPM s obsahom 0,5 mg.l<sup>-1</sup> zeatínu a 0,2 mg.l<sup>-1</sup> IAA za účelom ich ďalšej proliferácie a rastu. Po dvoch mesiacoch kultivácie explantátov na uvedenom médiu sa

vytvoril vysoký počet výhonkov (priemerný počet výhonkov na explantát bol 398 s priemernou výškou výhonku 2,14 cm).

Výsledky testovania potvrdili, že kanamycín v použitých koncentráciách pôsobil toxicky už po druhom týždni od založenia pokusu a do 6 týždňov všetky explantáty znekrotizovali. Predpokladáme, že nami zvolené koncentrácie kanamycínu boli vysoké a boli dôvodom silnej toxicity antibiotika.

### *Hygromycín*



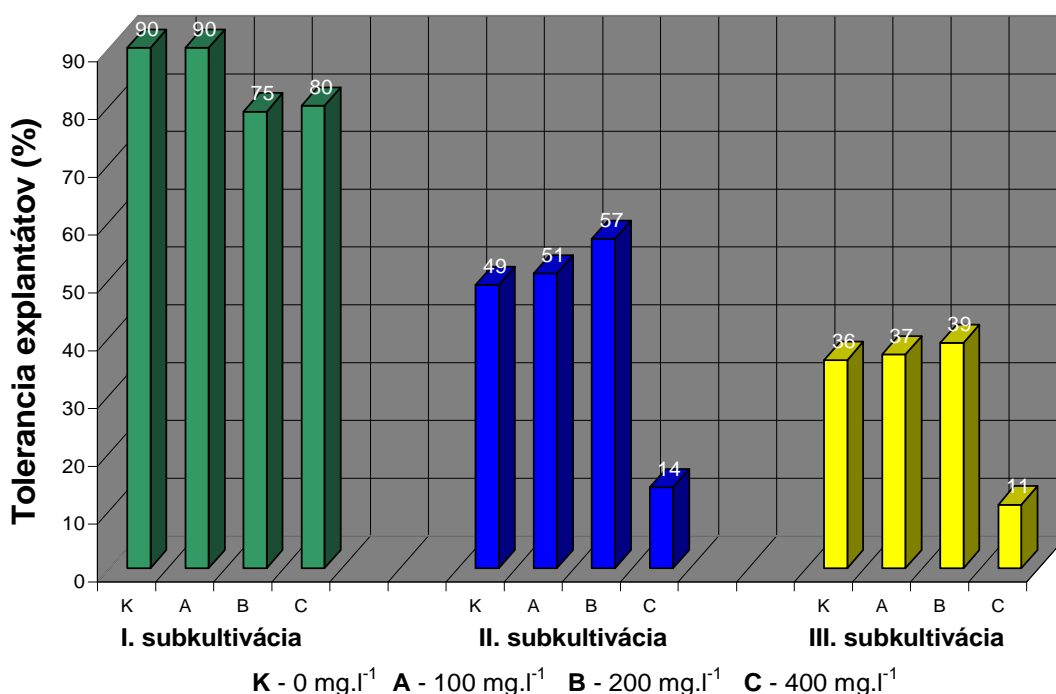
**Graf 2** Reakcia pletív listov odrody 'Berkeley' a ich tolerancia na hygromycín

Pôsobenie hygromycínu po dvoch týždňoch kultivácie sa prejavilo čiastočnou nekrotizáciou pri všetkých koncentráciách. Explantáty na kontrolnom variante média si zachovali životaschopnosť na 100 % a na koncentráciách hygromycínu 75 – 80 %. Po ďalších dvoch týždňoch kultivácie (pri druhej subkultivácii) nastal pokles prežívania pletív listov na kontrolnom médiu na 50%. Na médiách s hygromycínom sa už významne prejavil inhibičný účinok hygromycínu na pletivá listov. Tolerancia sa prejavila iba pri 13 - 54 % listoch. Počet prežívajúcich explantátov klesal so

zvyšujúcou sa koncentráciou hygromycínu v médiu. Ako najúspešnejší sa ukázal variant média s najnižšou koncentráciou hygromycínu ( $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Výrazný pokles nastal pri tretej subkultivácii vo všetkých variantoch použitých médií v rozsahu 3 – 32 %, v závislosti na obsahu hygromycínu v médiu. Inhibičný vplyv hygromycínu na pletivá listov bol opäť najnižší pri koncentrácii  $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Z výsledkov vyplýva, že inhibičný účinok sa zvyšuje s narastajúcou dĺžkou kultivácie a koncentráciou testovaného antibiotika. Nezaznamenali sme indukciu procesu adventívnej organogenézy ani pri kontrolnom médiu.

#### 4.2.2 Testovanie tolerancie pletív listov k antibiotiku cefotaxime

Vplyv cefotaximu uvedeného antibiotika sme testovali na pletivách listov odrody `Berkeley` a `Linnea`. Kontrolným médiom bolo opäť médium WPM s obsahom  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ. Pri hodnotení sme postupovali identicky ako pri predchádzajúcich experimentoch.

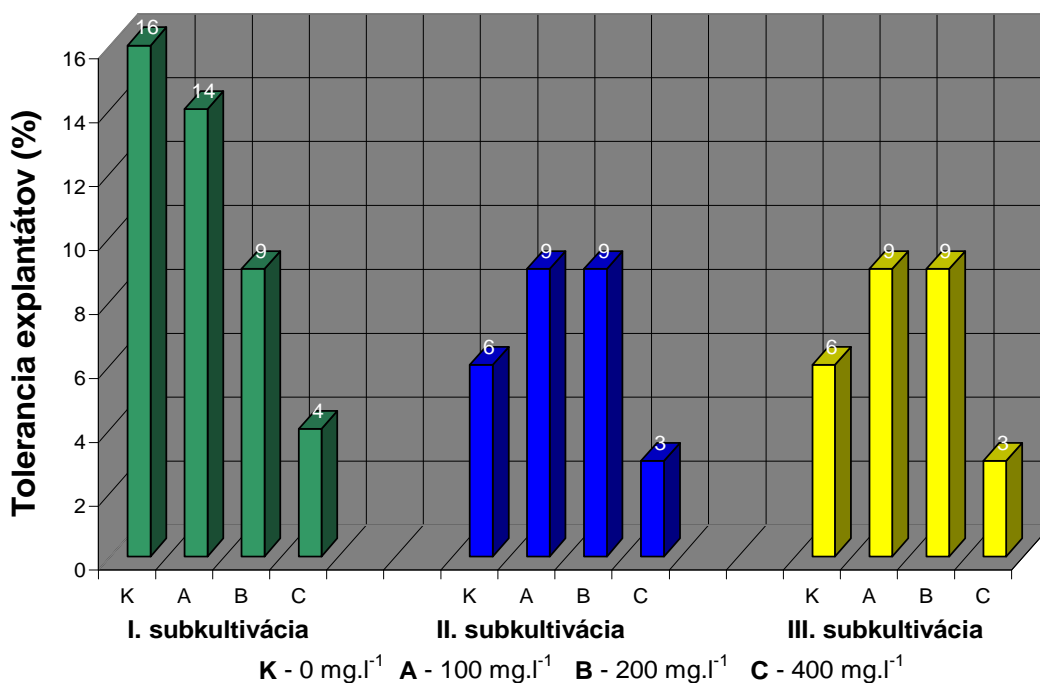


**Graf 3** Reakcia pletív listov odrody `Berkeley` a ich tolerancia na cefotaxim

Pri prvej subkultivácii percento prežívajúcich explantátov bolo vysoké a listy si zachovali pôvodnú zelenú farbu. Po 4 týždňoch kultivácie sme pozorovali nekrotický účinok cefotaximu, ktorý sa prejavil hlavne pri najvyššej koncentrácii, pri ktorej neprežilo 86 % explantátov. Na ostatných variantoch média nastala dokonca indukcia tvorby kalusového pletiva.

Pri ďalšej subkultivácii (po 6 týždňoch) klesol počet prežívajúcich explantátov na úroveň prežívania aj na kontrolnom médiu s výnimkou najvyššej koncentrácii, pri ktorej preživalo najmenej explantátov (11 %). Testované koncentrácie cefotaximu nepôsobili na listy toxicky. Z testovaných antibiotík sa preukázal cefotaxim ako efektívny aj pre regeneráciu. Zaznamenali sme indukciu adventívnej organogenézy na každom variante média.

Explantáty po zhodnotení boli prenesené na médium WPM s obsahom 0,5 zeatín a 0,2 IAA a po piatich mesiacoch kultivácie vytvorili 250 výhonkov na explantát s priemernou dĺžkou 2,13 cm.



**Graf 4** Reakcia pletív listov odrody `Linnea` a ich tolerancia na cefotaxim

Pri odrode 'Linnea' sme zaznamenali nízke prežívanie explantátov aj na kontrolnom médiu (graf 4), čo adekvátne sa prejavilo aj na médiách s obsahom cefotaximom, a to s poklesom prežívania listov v korelácii so zvyšovaním koncentrácie antibiotika (na 4%). Pri druhej subkultivácii prežívajúce listy tvorili len 3 - 9 %, ale pozitívnym prejavom bola regenerácia kalusového pletiva.

Pri treťom hodnotení stav prežívajúcich explantátov sa nezmenil. Prežívajúce pletivá listov dokázali regenerovať na variantoch média K, B, a C, na ktorých nastala iniciácia adventívnej organogenézy.

Po transfere explantátov z jednotlivých variantov médií na médium WPM s obsahom 0,5 zeatín a 0,2 IAA sme hodnotili počet výhonkov na explantát.

- Kontrolný variant - priemerný počet výhonkov bol 214 na explantát s priemernou dĺžkou 4,3 cm.
- Variant média B - priemerný počet výhonkov bol 172 na explantát s priemernou dĺžkou 4,1 cm.
- Variant média C - priemerný počet výhonkov na explantát bol 100 na explantát s priemernou výškou 2,3 cm.

Z uvedeného vyplýva, že indukcia a proliferácia výhonkov sa znižovala so zvyšujúcou sa koncentráciou cefotaximu.

## 5 DISKUSIA

### *Adventívna organogenéza*

Problematikou adventívnej organogenézy pri rode *Vaccinium spp.* sa zaoberali viacerí autori (Debnath a McRae, 2002; Meiners et al., 2007; Marcotrigiano et al., 1996; Gajdošová et al. 2004; Debnath, 2005; Gajdošová et al. 2007; Meiners et al., 2007). Autori za účelom indukcie adventívnej organogenézy testovali z cytokinínov zeatín a TDZ. V našich experimentoch zameraných na adventívnu organogenézu sme taktiež testovali ich účinok uvedených cytokinínov na iniciáciu a proliferáciu výhonkov.koncentráciu cytokinínov TDZ a zeatín.

Ako už bolo uvedené v tejto práci (1.6.4) kolektív autorov Meiners et al. (2007) sa zaoberal testovaním rôznych rastových regulátorov (TDZ, zeatín, meta-topolin) a ich koncentrácií za účelom zistenia najvhodnejších cytokinínov a ich koncentrácií, ktoré by najlepšie podporili iniciáciu výhonkov. Najúspešnejším cytokinínom sa ukázal zeatín s koncentráciou 20  $\mu\text{M}$  pri odrodách Red Pearl, `Ozarkblue`. Autori uvádzajú, že účinok zeatínu podporoval tvorbu a predlžovanie výhonov na uvedených explantátoch a pri TDZ nastala hlavne tvorba kalusu.

V porovnaní s našimi výsledkami testovania cytokinínov (TDZ, zeatín) v koncentráciách 10 a 20  $\mu\text{M}$  na listoch odrôd `Berkeley`, `Linnea` a `Ida` (tab.2) sme zaznamenali opačnú reakciu. Na zeatíne nastala tvorba kalusu a na TDZ tvorba výhonkov. Ako najúspešnejší variant sa v našom experimente ukázalo médium s TDZ v koncentrácii 2,2  $\text{mg.l}^{-1}$  (10  $\mu\text{M}$ ), na ktorom najviac listov tvorilo výhony pri odrodách `Berkeley`, `Linnea`. Pri odrode `Ida` sa tvoril len kalus. Explantáty kultivované na médiu s obsahom zeatínu netvorili žiadne výhony ani pri jednej odrode. Predpokladáme, že rozdiely účinku cytokinínov na iniciáciu tvorby adventívnych výhonkov, pozorované pri našom experimente v porovnaní s výsledkami spomínaných autorov, môžu závisieť od špecifických nárokov a rozdielnej reakcie danej odrody na jednotlivé cytokiníny.

Porovnávaním rastových regulátorov (TDZ, zeatín) a určením ich najvhodnejšej koncentrácie za účelom dosiahnutia najlepšej iniciácie výhonkov sa zaoberali, napr. aj autori Debnath a McRae (2002). Pri zeatíne ako najvhodnejšia sa prejavila koncentrácia 20  $\mu\text{M}$  a pri TDZ 5  $\mu\text{M}$ .

V našom experimente zo zeatínom (tab. 3) sa nevytvorili žiadne výhony ani pri

jednej koncentrácii. Z tabuľky 3 vyplýva, že na tomto negatívnom výsledku sa do značnej miery podieľa kontaminácia, zvlášť pri odrode 'Ida' kultivovaná na médiu so zeatínom.

Autori Debnath (2005), Debnath a McRae (2002) najväčšiu tvorbu výhonkov dosiahli na médiu s 5  $\mu\text{M}$  TDZ (1,1  $\text{mg.l}^{-1}$ ) čo sa zhoduje (tab. 4) v prípade odrody 'Berkeley' s našimi údajmi. Ďalšie odrody už nepreukázali regeneračnú schopnosť (tab. 5 – 8) pri žiadnej z testovaných koncentrácií TDZ.

Výsledky v našich experimentov a uvedených autorov potvrdili rozdielne reakcie odrôd na jednotlivé cytokiníny a zároveň naznačujú že na iniciáciu adventívnych výhonkov efektívne môže pôsobiť TDZ v nižšej koncentrácii - 1,1  $\text{mg.l}^{-1}$  (5  $\mu\text{M}$  TDZ), čo sa prejavilo preukazne pri odrode 'Berkeley'.

#### *Testovanie koncentrácií antibiotík*

V ďalšej časti práce sme sa zaoberali testovaním selekčných antibiotík (kanamycín, hygromycín) a antibiotika cefotaxime na proces regenerácie odrôd 'Berkeley', 'Linnea' za účelom využitia výsledkov na elimináciu baktérie *Agrobacterium tumefaciens* po genetických transformáciach a selekciu transformovaných pletív. Touto problematikou testovania alebo použitia cefotaximu a iných antibiotík na regeneráciu v kultúre *in vitro* sa zaoberali viacerí autori (Deepinder et al., 2006; Nauerby et al., 1997; Bhau a Wakhlu, 2001; Song a Sink, 2004 atď.).

Podobne touto problematikou sa zaoberali aj autori Xing et al. (2009), ktorý testovali antibiotiká (kanamycín, cefotaxime, karbenicilin) na regeneráciu listov odrôd ('Sunrise', 'Geo') druhu *Vaccinium corymbosum* L. Listy odrody 'Sunrise' boli kultivované na médiu s obsahom 4,0  $\text{mg.l}^{-1}$  zeatín, 1,0  $\text{mg.l}^{-1}$  TDZ, 0,3  $\text{mg.l}^{-1}$  IBA a pri odrode 'Geo' bolo použité kultivačné médium s obsahom 4,0  $\text{mg.l}^{-1}$  zeatín a 0,3  $\text{mg.l}^{-1}$  IBA. Výsledky, ktoré uveden autori popísali vo svojej práci ukázali silný inhibičný účinok kanamycínu pri koncentráciách 10 a 20  $\text{mg.l}^{-1}$ , ktorý sa prejavil ich odumretím. Cefotaxim pôsobil inhibične na regeneráciu listov pri koncentrácií 600  $\text{mg.l}^{-1}$  a karbenicilin pri 500  $\text{mg.l}^{-1}$ . V našom experimente v porovnaní s uvedeným experimentom (Xing et al., 2009) sme použili vyššie koncentrácie kanamycínu (najnižšia bola 25  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Každá koncentrácia pôsobila veľmi silným inhibičným účinkom, ktorý sa prejavil nekrotizáciou všetkých explantátov.



Testovaním jednotlivých koncentrácií antibiotika cefotaxime sa nám ukázali ako vhodné varianty pri oboch odrodách  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $200 \text{ mg.l}^{-1}$ . Vyššie koncentrácie mali výrazný inhibičný účinok.

Na antibiotiku hygromycíne sa nám podarilo dosiahnuť regeneráciu explantátov pri všetkých variantoch, ale aj napriek tomu boli použité koncentrácie ešte vysoké. Počet listov, pri ktorých nastala regenerácia bol veľmi nízky.

Použitie hygromycínu na regeneračnom médiu pri genetických transformáciach rôzneho ovocia využívalo viacero autorov (Oosumi et al., 2005; Mathews et al., 1995; Sibbald et al., 2006; Tien et al., 2009).

## ZÁVER

*Vaccinium corymbosum* L. a *Vaccinium vitis-idaea* L. patria medzi druhy významné z viacerých hľadísk so širokým využitím. S uvedeným súvisí neustály nárast záujemcov o ich pestovanie. Dôležitým faktorom pre rozšírenie pestovania týchto druhov drobného ovocia je zabezpečenie dostatku sadbového materiálu. Zatiaľ najvyužívanejším spôsobom rozmnoženia je klasické vegetatívne - drevnatými odrezkami.

Ostatných rokoch sa do popredia dostávajú progresívne techniky *in vitro*, ktoré umožňujú efektívnu reprodukciu, nezávisle na vegetačnom období. Adventívna organogenéza je jedinečný proces regenerácie v podmienkach *in vitro*. Je jednou z techník *in vitro*, zaujímavou z teoretického, ale významnou aj z praktického hľadiska .

V našej práci sme sa zaoberali indukciou regenerácie a proliferácie výhonkov metódou adventívnej organogenézy. Za uvedeným účelom sme testovali koncentrácie cytokinínov - TDZ a zeatínu na indukciu regenerácie listov odrôd `Berkeley` druhu *Vaccinium corymbosum* L. a odrôd `Linnea`, `Ida`, `Red Pearl` druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. Z testovaných odrôd preukázala najlepší regeneračný potenciál odroda `Berkeley`, čo potvrdila tvorba adventívnych výhonkov na kultivačnom médiu s obsahom TDZ v koncentrácii od 1,1 – 5,5 mg.l<sup>-1</sup>. Najvyšší počet výhonkov sme dosiahli na koncentrácii 1,1 mg.l<sup>-1</sup>, na ktorej priemerný počet výhonkov na explantát bol 12,8, ktorý sme dosiahli v 5 mesiaci kultivácie. Táto odroda sa javila ako najvitálnejšia. Listy pri ostatných odrodách pri všetkých testovaných koncentráciách cytokinínov postupne nekrotizovali. Perspektívnymi z hľadiska indukcie procesu adventívnej organogenézy sa javia aj odrody `Linnea` a `Ida`, kde sme zaznamenali tvorbu kalusu a objavila sa aj diferenciácia adventívnych výhonkov.

V ďalšej sérii pokusov sme sa zaoberali testovaním rôznych koncentrácií selekčných antibiotík (kanamycín, hygromycín) na regeneráciu pletív listov odrody `Berkeley` a zistením ich tolerancie k antibiotikám s cieľom detekcie koncentrácie, pri ktorej pletivá listov by si ešte zachovali dobrú regeneračnú schopnosť. V experimente s antibiotikom kanamycín boli nami zvolené koncentrácie vysoké. Pri tretej subkultivácii sme zaznamenali úplnu nekrózu listov. Percento prežívania listov na kultivačných médiách s dĺžkou kultivácie sa znižovalo, čo bolo všeobecným javom pri

všetkých testovaných antibiotikách. Percento prežívania pletív listov na hygromycíne klesalo od najnižšej po najvyššiu koncentráciu antibiotika. Prežívanie listov pri najvyššej koncentrácii ( $10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) klesalo z 80% pri prvej subkultivácii na 2% pri tretej subkultivácii, pričom najúspešnejšia bola najnižšia ( $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) (46%). Aj napriek dosiahnutej regenerácii pletív listov sme zhodnotili, že nami zvolené koncentrácie boli vysoké a pôsobili silnejším inhibičným účinkom na prežívanie pletív ako bolo prípustné.

Testovanie koncentrácií antibiotika cefotaxim, ktoré slúži na elimináciu baktérie *Agrobacterium tumefaciens* po genetických transformáciach, sme uskutočnili pri odrodách - `Berkeley` a `Linnea`. Pri oboch odrodách sa nám podarilo dosiahnuť indukciu adventívnej organogenézy. Odroda `Berkeley` sa aj pri tomto experimente prejavila ako vitálnejšia. Percento prežívajúcich listov bolo oveľa vyššie ako pri odrode `Linnea`. Celkové hodnotenie dokazuje, že cefotaxim v testovaných koncentráciách nepôsobil výrazne toxickým účinkom. Ako najvhodnejšia koncentrácia pri odrode `Berkeley` sa ukázala koncentrácia  $200 \text{ mg.l}^{-1}$ , pri ktorej aj po tretej subkultivácii prežívalo 11 - 39 % explantátov. Listy odrody `Linnea` preukázali všeobecne veľmi nízke prežívanie, a to aj na kontrolnom médiu (6 - 16 %), čo sa odrazilo aj na médiách s obsahom antibiotík pri všetkých koncentráciách (3 - 9 %). Pri odrode `Linnea` prežilo len 9 % explantátov pri koncentracii  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  cefotaximu, ako aj koncentrácii  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ , ale významným je, že na explantátoch nastala indukcia adventívnej organogenézy.

## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

FUTÁK, J. – BERTO VÁ, L. 1982. *Flóra Slovenska III*. Bratislava : VEDA. 1982, 349-355 s.

BEŽO, M. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – KUTIŠOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, 2005. *Genetické inžinierstvo rastlín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 2005, 134 s. ISBN 80-8069-636-5.

BHAU, B. S. – WAKHLU, A. K. 2001. Effect of Some Antibiotics on the *In Vitro* Morphogenetic Response from Callus Cultures of *Coryphantha Elephantidens*. In *Biologia Plantarum*, roč. 44, 2001, s. 19-24.

BOBÁK, M. – ŠAMAJ, J. 1999. *Cytológia*. Bratislava: Univerzita Komenského. 1999, 280 s. ISBN 80-223-1374-2.

*BRUSNICA PRAVÁ (Vaccinium vitis-idaea L.)*. [online] [cit. 2010-3-5]. Dostupné na internete: <<http://www.agroporadenstvo.sk/rv/ovocie/brusnica.htm>>.

CAO, X. – LIU, Q. – ROWLAND, L. J. – HAMMERSCHLAG, F. A. 1998. GUS expression in blueberry (*Vaccinium spp.*): factors influencing Agrobacterium-mediated gene transfer efficiency. In *Plant Cell Reports*, roč. 18, 1998, č. 3-4, s. 266-270, ISSN 1432-203X.

CASTELLANO, M. M. – SABLÓWSKI, R. 2005. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. In: *Current Opinion Plant Biology*, roč. 8, 2005, s. 26-31.

ČERVENKA, M. – ČINČURA, F. – JASIČOVÁ, M. – ZÁBORSKÝ, J. 1986. *Slovenské botanické názvoslovie*. Bratislava : Príroda. 1986, 520 s.

Čučoriedka chocholíkatá [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupné na internete: <http://www.wellberry.sk/index.php?page=4&jazyk=&obr=4&modul=0>.

DEBNATH, S. C. 2003. Improved shoot organogenesis from hypokotyl segments of Lingonberry (*Vaccinium vitis – idaea L.*). In *In vitro cellular and developmental biology*. Plant journal of the Tissue Culture Association, 2003, č. 39, s. 490-495.

DEBATH, S. C. 2005. A Two-step Procedure for Adventitious Shoot Regeneration from in vitro derived Lingonberry Leaves: Shoot Induction with TDZ and Shoo Elongation Using Zeatin. In: *HortScience*, roč. 40, 2005, č. 1, s. 189-192.

DEBNATH, S. C. – McRAE, K. B. 2002. An efficient adventitious shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea L.*): The influence of Cytokinins and Media Types on Propagation. In *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, roč. 77, 2002, č. 6, s. 744-752.

DEBNATH, S. C. – da SILVA, J. A. T. 2007. Strawberry Culture *In vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. In *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, UK : Global Science Book, 2007, s. 5-12.

DEEPINDER, G. – RAMAN, G. – SATBIR, G. S. 2006. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. In *Biotechnology Journal*, roč. 1, 2006, č. 10, s. 1158-1162.

DOSTÁL, J. – ČERVENKA, M. 1992. *Veľký kľúč na určovanie vyšších rastlín*. Bratislava : Slovenské pedagogické nakladateľstvo. 1992, 569 s. ISBN 80-08-00273-5.

DUŠKOVÁ, L. – KOPŘIVA, J. 2003. *Pěstujeme maliny, ostružiny a borůvky*. Praha : Grada Publishing a.s. 2003, 16-32 s. ISBN 80-247-0532-X.

ERDELSKÝ, K. – FRIC, F. 1979. *Praktikum a analytické metódy vo fyziológii rastlín*. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo. 1979, 478 s.

FERGUSON, L. – LESSENGER, J. E. 2006. *Plant Growth Regulators*. New York : Springer New York. 2006, 156-166 s. ISBN 978-0-387-30105-1.

GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M. G. – ONDRUŠKOVÁ, E. – KAMÄRÄINEN, T. – KARPINEN, T. 2004. Adventitious organogenesis of selected *Vaccinium* spp. and cultivars and characterization of in vitro obtained clones. In Proceeding from COST 843, WG1 meeting Competence Gene Transfer and Expression, Special Aspects of Micropropagation, Crete, 18-21 November 2004. Heraklion: Organization TEI of Crete School of Agricultural Technology, 2004, s.18-20.

GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M. G. – ONDRUŠKOVÁ, E. – LIBIAKOVÁ, G. 2006. Plant regeneration via adventitious organogenesis – an efficient propagation systém in *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium vitis-idea* L. In: *Abstract book „Berry plant quality and sustainable production“ COST 863 JM WG 2&3*, 19-22. Apríl 2006, Zagreb, Croatia, s.20.

GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M. G. – LIBIAKOVÁ, G. – ONDRUŠKOVÁ, E. 2007a. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Jain S.M. and Häggman H. (eds.) Springer, Dodrecht, The Netherlands, 2007. s. 457-464, ISBN 978-1-4020-6351-0 (HB).

GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M. G. – LIBIAKOVÁ, G. – ONDRUŠKOVÁ, E. 2007b. Efficient adventitious shoot regeneration in *Vaccinium* spp. and *Rubus* spp. In *Book of Abstracts, Propagation of Ornamental Plants*, 5-8 September, 2007, Sofia, Bulgaria, 2007. s. 109, ISBN-978-954-90425-4-2.

GEORGE, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. *The technology*. Edington: Exegetics Limited, 1993, s. 570.

GÖTZ, G. – SILBEREISEN, R. *OBSTSORTEN – ATLAS. Kernobst, steinobst, beerenobst, schalenobst.* Stuttgart: VERL. EUGEN ULMER. 1989, 335 s.

GRAHAM, J. et al. 1995. Agrobacterium-Mediated Transformation of Soft Fruit *Rubus*, *Ribes*, and *Fragaria*. In *Agrobacterium protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., 1995, s.129.

GRAHAM, J. – McNICOL, R. J. – KUMAR, A. 1996. Transformation of blueberry without antibiotic selection. In: *Annals of applied Biology*, roč. 128, 1996, č. 3, s. 557-563.

GUSTAVSSON, B. A. 1999. UPRAWA BORÓWKI BRUSZNICY (*Vaccinium vitis-idaea* L.) W SZWECJI. In *UPRAWA BORÓWKI I ŻURAWINY*. Skierniewice : Institut Sadownictwa I Kwaciarsdtva, 1999, 34-39 s. ISBN 83-87617-53-9

HALKO, J. – KRČMÉRY, V. 1989. *Protinádorové a protimikrobiálne antibiotiká a chemoterapeutiká.* Bratislava: Alfa. 1989, 363-366 s. ISBN 80-05-00179-7.

HAY, A. – TSIANTIS, M. 2005. From genes to plants via meristems. In: *Development*, roč. 132, 2005, s. 2679 – 2684.

*HIGROMYCIN B*. 2009. [online] [cit. 2010-03-15]. Dostupné na internete: <<http://www.hygromycin.net/>>.

HRIČOVSKÝ, I. et al. 2002. *Drobné ovocie a menej známe druhy ovocia.* Bratislava : Príroda. 2002, 140 s. ISBN 80-07-00986-8.

HRIČOVSKÝ, I. – PAULEN, O. – ŠIMALA, D. – HORČÍN, V. 2004. *Ovocinárstvo* [CD-ROM]. Nitra : ÚVTIP, 2004.

HRÚBIKOVÁ, K. – BEŽO, M. – KUTIŠOVÁ, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – GAJDOŠOVÁ, A. – OSTROLUCKÁ, M. G. – HRICOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. 2009. *Explantátové kultúry rastlín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 2009, 34 s. ISBN 978-80-552-0323-2.

HUDÁK, J. et al. 1991. *Biológia rastlín*. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo. 1991, s. 318 – 400, ISBN 80-08-00065-1.

CHAUVIN, J. E. – MARHADOUR, S. – COHAT, J. – Le NARD, M. 1999. Effects of gelling agents on *in vitro* regeneration and kanamycin efficiency as a selective agent in plant transformation procedures. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, roč. 58, 1999, s. 213-217.

KAMENICKÁ, A. – VIZÁROVÁ, G. 2000. *Mikrorozmnožovanie okrasných drevín*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 2000, 7-49 s. ISBN 80-7137-725-2.

*Kanamycin (kanamycinum)*. 2009. [online] [cit. 2010-03-15]. Dostupné na internete: <<http://lekarstwo.ru/en/preparati/kanamycinum.html>>.

KRESÁNEK, J. – KREJČA, J. 1982. *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*. Martin : Osveta. 1982, 232 s.

MARCOTRIGIANO, M. – McGLEW, S. P. – HACKETT, G. – CHAWLA, B. 1996. Shoot regeneration from tissue cultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). In *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, roč. 44, 1996, s. 195-198.

MAREČEK, F. 1994. *Zahradnícký slovník naučný*. Díl 1. A-C. Praha : Ústav zeměd. a potravin. 1994, 223-225 s. ISBN 80-85120-51-8.

MARHOLD, K. – HINDÁK, F. 1998. *Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska*. Bratislava : VEDA. 1998, 687 s. ISBN 80-224-0526-4.



MATHEWS, H. – WAGONER, W. – COHEN, C. – KELLOGG, J. – BESTWICK, R. 1995. Efficient genetic transformation of red raspberry, *Rubus ideaus* L. In *Plant Cell Reports*, roč. 14, 1995, s. 471-476.

MAUSETH, J. D. 2003. Botany: an introduction to plant biology. 3<sup>th</sup> ed. [CD-ROM]. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers. 2003, 411 s. ISBN 0-7637-2134-4.

McNICOL, R. J. – GRAHAM, J. 1990. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, roč. 21, 1990, č. 1, s. 45-50.

MEINERS, J. – SCHWAB, M. – SZANKOWSKI, I. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, roč. 89, 2007, č. 2/3, s. 169-176.

MOK, M. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Dacus carota*. In *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, roč. 101, 1976, 422 s.

NAUERBY, B. – BILLING, K. – WYNDAELE, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. In *Plant Science*, roč. 123, 1997, č. 1, s. 169-177.

NOWAK, B. – MICZYŃSKI, K. 2002. The course and efficiency of organogenesis on leaf explants of plum `Wegierka Zwyczajna` (*Prunus domestica*) induced by cytokinins. In *Electronic Journal of Polish Agricultural universities*, roč. 5, 2002, č. 1, s. 4-6, ISSN 1505-0297.

ONDRUŠKOVÁ, E. - OSTROLUCKÁ M. G. 2006. Adventívna organogenéza druhu *Vaccinium vitis-idaea* L. In VII. vedecká konferencia doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov pod záštitou dekana FPV s medzinárodnou účasťou, konaná dňa 6. 4. 2006 v Nitre, UKF FPV, 88, s. 13, ISBN 80-8050-960-3.

OOSUMI, T. – GRUSZEWSKI, H. A. – BLISHAK, L. A. – BAXTER, A. J. – WADL, P. A. – SHUMAN, J. L. – VEILLEUX, R. E. – SHULAEV, V. 2005. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. In *Planta*, roč. 223, 2005, č. 6, s. 1219-1230.

OSTROLUCKÁ, M.G. – GAJDOŠOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. – HRUBÍKOVÁ, K. – BEŽO, M. 2007. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Jain S.M. and Häggman H. (eds.) Springer, 2007. kapitola 41, s. 445-455, ISBN 978-1-4020-6351-0 (HB).

PASTÝRIK, Ľ. 1979. *Fyziológia rastlín*. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo. 1979, 271 s.

PIERIK, R. L. M. 1997. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. 1997, s. 348, ISBN 0-7923-5267-X.

PREŤOVÁ, A. 1995. *Embryogenéza vyšších rastlín v in vitro podmienkach*. Bratislava : VEDA. 1995, 60 s. ISBN 80-224-0419-5.

RAO, S.M. – RAVISHANKAR, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. In *Biotechnology Advances*, roč. 20, 2002, č. 2, s. 105.

SALAJ, T. – BLEHOVÁ, A. 2006. *IN VITRO KULTÚRY VYŠŠÍCH RASTLÍN*. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava, 2006. 158 s. ISBN 80-223-2061-7.

SERRES, R. A. – ZELDIN, E. L. – McCOWN, B. H. 1997. Applying biotechnological approaches to *Vaccinium* improvement. In *Acta Horticulturae*, roč. 446, 1997, s. 221-226.

SHIBLI, R. A. – SMITH, M. A. L. 1996. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillos* (bilberry) leaf explants. In *HortScience*, roč. 31, 1996, č. 7, s. 1225-1228.

SIBBALD, S. – WANG, X. – WEN, Y. – TIAN, L. – KOHALMI, S. E. 2006. Genetic transformation of *Prunus domestica* using hygromycin resistance as selection for plum pox virus research. In *Phytopathology*, roč. 96, 2006, č. 6, s. 107.

da SILVA, J. A. T. – FUKAI, S. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. In *Journal of Applied Horticulture*, roč. 3, 2001, č. 1, s. 3-12.

*Skúsenosti s pestovaním veľkoplodých čučoriedok* [2008-02-13] [online] [cit. 2010-03-05]. Dostupné na internete: [http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/ovocnarska-vyroba/Skusenosti-s-pestovanim-velkoplodych-cucoriedok\\_\\_s513x44672.html](http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/ovocnarska-vyroba/Skusenosti-s-pestovanim-velkoplodych-cucoriedok__s513x44672.html).

SONG, G. Q. – SINK, K. C. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). In *Plant Cell Reports*, roč. 23, 2004, č. 7, s. 475-484.

SWARTZ, H. J. – BORS, R. – MOHAMED, F. – NAESS, S. K. 1990. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. In *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, roč. 21, 1990, s. 179-184.

ŠEBÁNEK, J. et al. 1983. *Fyziologie rostlin*. Praha: SZN. 1983, 558 s.

ŠIMALA, D. 1999. Skúsenosti s pestovaním čučoriedky obyčajnej, brusnice pravej a čučoriedky vysokej v podmienkach severného Slovenska. In *Využitie niektorých alternatívnych plodín v podhorských a horských oblastiach Slovenska*. Banská Bystrica : VÚTPHP. 1999, 16-17 s.

ŠIMALA, D. 2001a. Možnosti využitia produkčných schopností čučoriedok a brusníc. In *Naše pole*, roč 5, 2001, č. 2, s. 10, ISSN 1335-2466.

ŠIMALA, D. 2001b. Pestovanie čučoriedky chocholíkatej v horských oblastiach SR. In *Informace pro zahradnictví*, roč. 5, 2001, č. 3, s. 5, ISSN 1212-3781.

ŠIMALA, D. 2002. Možnosti pestovania a využitia introdukovaných druhov *Vaccinium* na Slovensku. In *Tradičné a netradičné druhy rastlín vo výžive, poľnohospodárstve a rozvoji vidieka*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002, s. 23-24 ISBN 80-8069-297-1.

ŠIMALA, D. - OSTROLUCKÁ, M. G. 2002. Brusnica chocholíkatá – vyhľadávaný ovocný druh. In *Zahradnictví*, roč. 94, 2002, č. 5, s. 11, ISSN 1213-7596.

ŠIMALA, D. 2005. Perspektíva pestovania brusnice pravej v SR - sortiment odrôd a využitie plodov. In *Zahradnictví*, roč. 97, 2005, č.5, s. 16–17, ISSN 1213-7596.

ŠIMALA, D. – OSTROLUCKÁ, M.G. 2005a. Cultivation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Mountain regions of Slovakia. In: *Kultúra brusničnych jagodnikov: itogi i perspektivy*. Materialy meždunarodnoj naučnoj konferencii. Central'nyj Botaničeskij sad, Nacional'naja akademija nauk Belorusi, Minsk, 15.-19.VIII. 2005, s. 60-64.

ŠIMALA, D. - OSTROLUCKÁ, M.G. 2005b. Skúseností s ekologickým pestovaním brusnice pravej (*Vaccinium vitis-idaea* L.) na Slovensku. In: *Acta Horticulturae et Regiotecturae*. SPU Nitra, mimoriadne čís. 2005, s. 57-61 ISSN 1335-2563.

ŠIMALA, D. 2007a. Možnosti pestovania brusnice chocholíkatej. In *Zahradníctví*, roč. 99, 2007, č.3, s. 14-15, ISSN 1213-7596.

ŠIMALA, D. 2007b. Brusnica chocholíkatá (*Vaccinium corymbosum* L.). In *Zahradníctví*, roč. 99, 2007, č. 4, s. 12-14, ISSN 1213-7596.

ŠIMALA, D. 2007c. Vlastná úroda brusníc. In *Záhradkár*, roč. 43, 2007, č.8, s. 51, ISSN 0862-5565.

ŠIMALA, D. – OSTROLUCKÁ, M. G. – GAJDOŠOVÁ, A. 2007. Cultivation of selected lingonberry varieties in Mountain regions of Slovakia. In *Acta Horticulturae et Regiotecturae*. SPU Nitra, mimoriadne čís., 2007, roč. 10, s. 33–36, ISSN 1335-2563.

TANG, W. – HARRIS, L. – NEWTON, R. J. 2003. Influences of antibiotics on plantlet regeneration via organogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In *Journal of Forestry Research*, roč. 14, 2003, č. 3, s. 185-190, ISSN 1993-0607.

TANG, W. – LUO, H. 2002. Antibiotics stimulate callus growth and in vitro shoot regeneration in loblolly pine (*Pinus Taeda* L.). In *Propagation of Ornamental Plants*, roč. 2, 2002, č. 2, s. 3-8.

TIAN, L. – CANLI, F. A. – WANG, X. – SIBBALD, S. 2009. Genetic transformation of *Prunus domestica* L. using the *hpt* gene coding for hygromycin resistance as the selectable marker. In *Scientia Horticulturae*, roč. 119, 2009, č. 3, s. 339-343.

TREHANE, J. 2004. *Blueberries, Cranberries and other Vacciniums*. Portland : Royal Horticultural Society with Timber Press, Inc. 2004, 29-101 s. ISBN 0-88192-615-9.

VOLÁK, J. – STODOLA, J. – SEVERA, F. 1987. *Velká kniha léčivých rostlín*. Bratislava : Příroda. 1987, 221 s.

VOLLMANNOVÁ, A. et al. 2009. Obsah bioaktívnych zložiek vo vybraných odrodách čučoriedky chocholikatej (*Vaccinium corymbosum* L.). In *Acta fytotechnica et zootechnica* [online], roč. 12, 2009, č. Mimoriadne, s. 695-700 [cit. 2010-04-10].  
Dostupne na:  
<[http://www.fem.uniag.sk/acta/sk/1/acta\\_fytotechnica\\_et\\_zootechnica/obsah/2009/mimoriadne\\_-\\_special/631/](http://www.fem.uniag.sk/acta/sk/1/acta_fytotechnica_et_zootechnica/obsah/2009/mimoriadne_-_special/631/)>

WENHAO, D. – CASTILLO, C. 2007. Factors Affecting Plant Regeneration from Leaf Tissues of Buddleia Species. In *HortScience*, roč. 42, 2007, č. 7, s. 1670-1673.

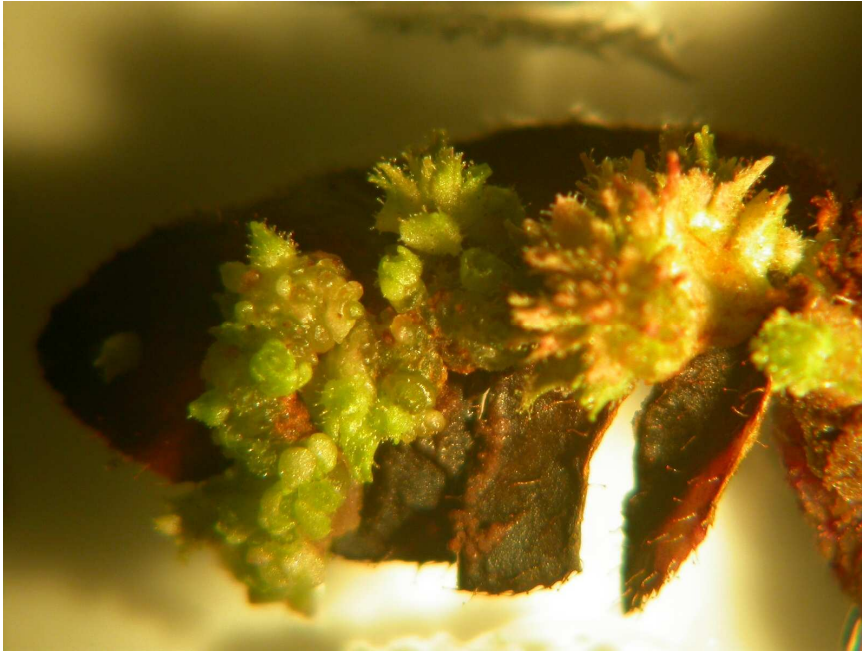
XING, R. D. – LIU, Q. Z. – CHEN, X. – LI, Y. D. 2009. Effects of Antibiotics on Regeneration of Leaves of Two Blueberry Cultivars. In *Journal of Jilin Agricultural University*, roč. 31, 2009, č. 5, s. 524-527.

ZALACAIN, M. – GONZALEZ, A. – GUERRERO, M. C. – MATTALIANO, R. J. – MALPARTIDA, F. – JIMÉNEZ, A. 1986. Nucleotide sequence of the hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygrosopicus*. In *Nucleic Acid Res.* Roč. 14, 1986, č. 4, s. 1565-1581.

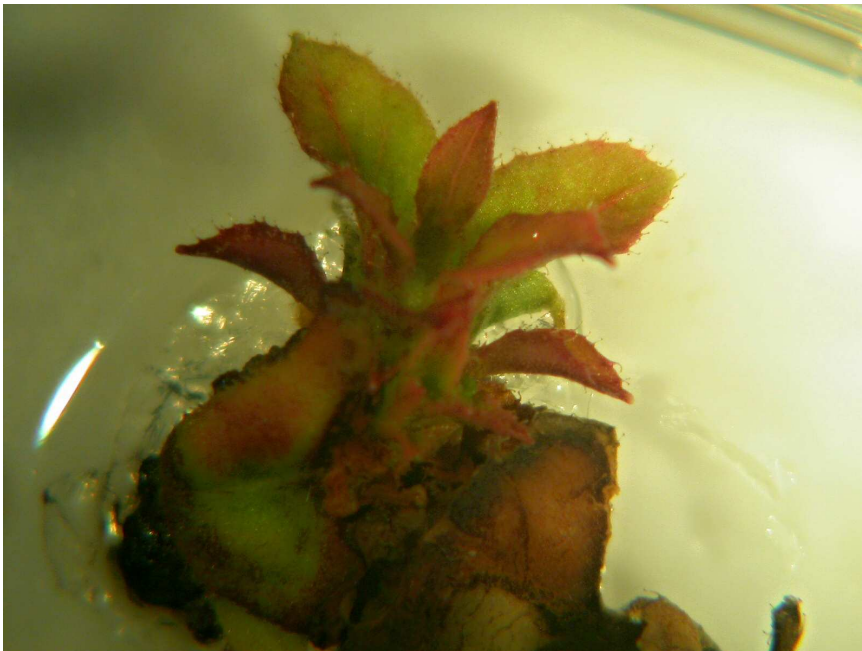
ZIMA, M. – KOSTREJ, A. – JUREKOVÁ, Z. – DANKO, J. – KUBOVÁ, A. – HOJČUŠ, R. – ČERNÁ, K. – BRESTIČ, M. – OLŠOVSKÁ, K. 2002. *Fyziológia rastlín*. 3. vydanie. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 2002, 128-129 s. ISBN80-8069-011-1.

## **PRÍLOHY**

## Ilustrácia priamej adventívnej organogenézy



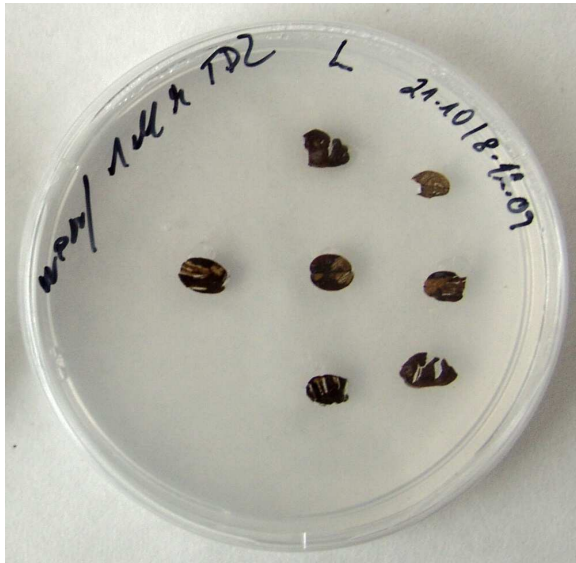
Obr. 2 Masová diferenciácia adventívnych púčikov na liste odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ



Obr. 3 Rast adventívnych výhonkov indukovaných z pletiva listu odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ



**Ilustrácia prežívania listov na WPM médiu s obsahom rôznych koncentrácií TDZ**



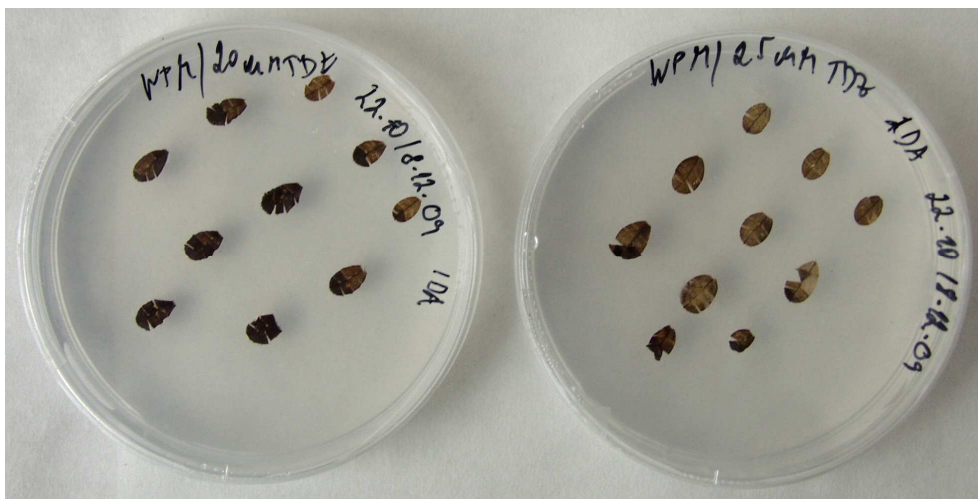
**Obr. 4** Listy odrody 'Linnea' na médiu WPM s obsahom  $0,55 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ



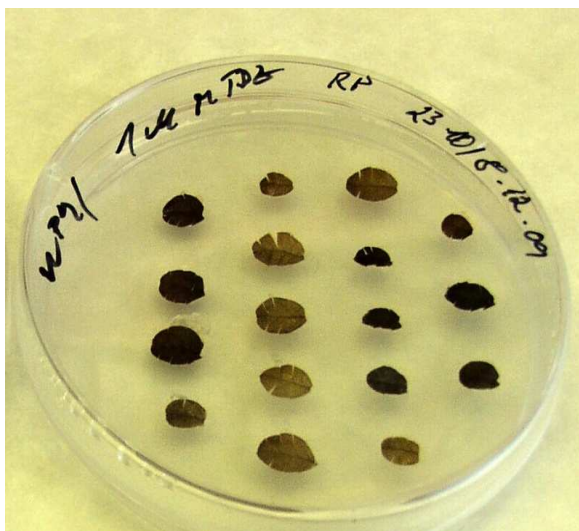
**Obr. 6** Listy odrody 'Linnea' na médiu WPM s obsahom  $4,4$  a  $5,5 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ



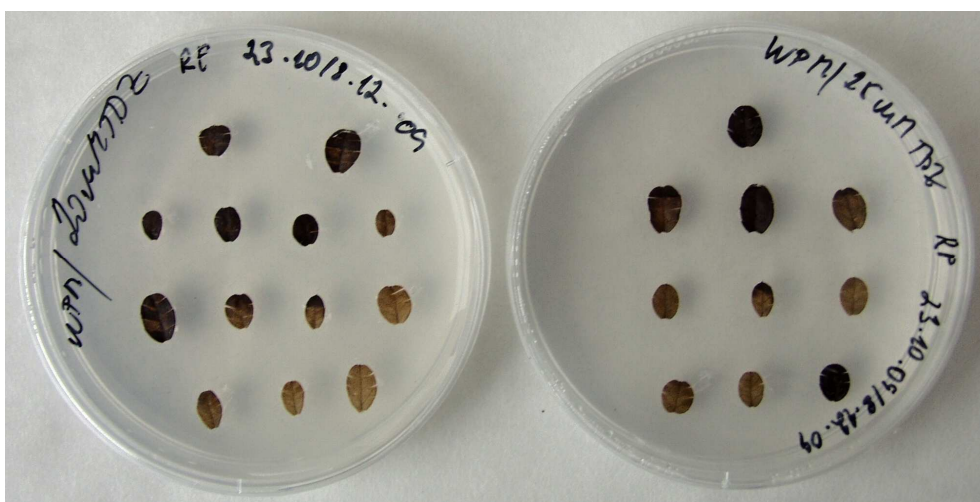
Obr. 7 Listy odrody 'Ida' na médiu WPM s obsahom  $0,55 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ



Obr. 9 Listy odrody 'Ida' na médiu WPM s obsahom  $4,4$  a  $5,5 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ

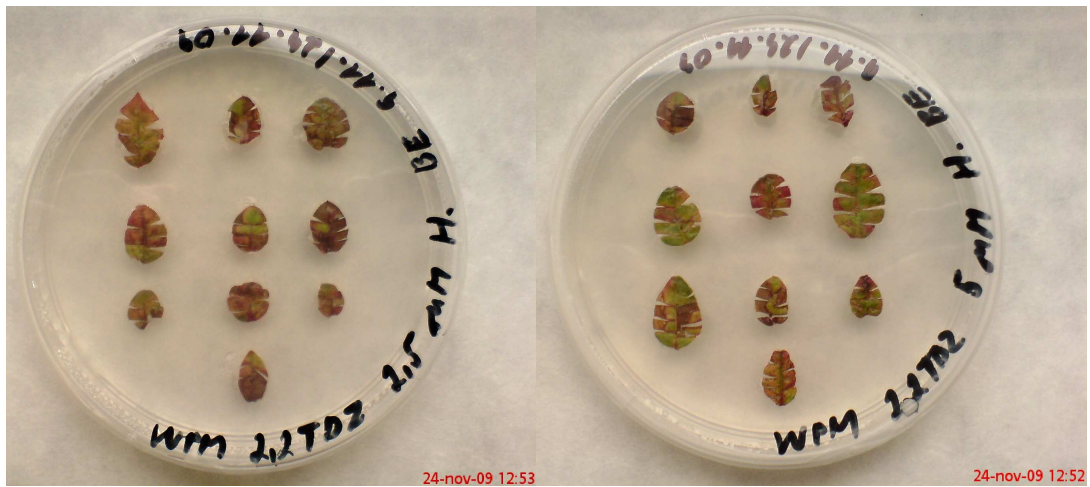


Obr. 10 Listy odrody 'Red Pearl' na médiu WPM s obsahom  $0,55 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ

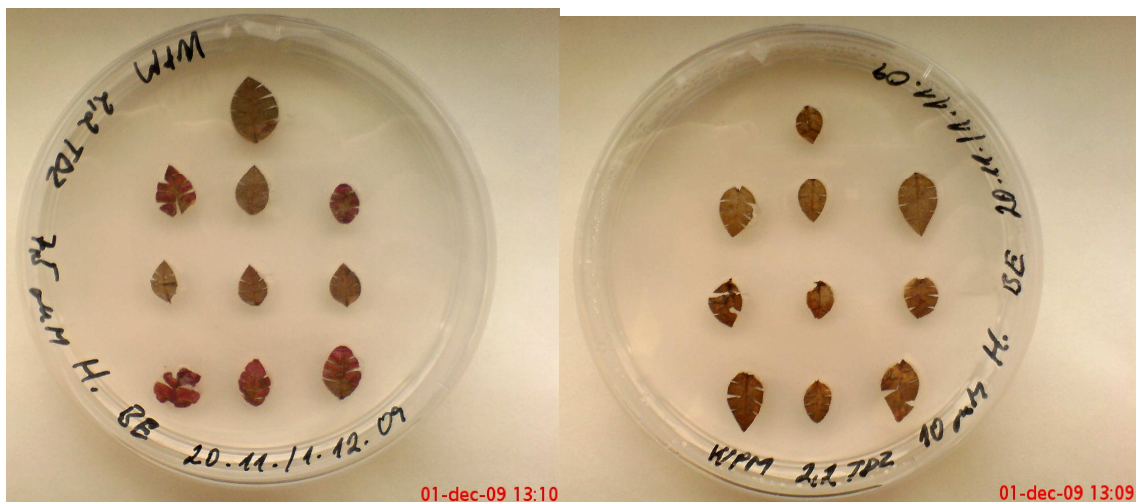


Obr. 12 Listy odrody 'Red Pearl' na médiu WPM s obsahom  $4,4$  a  $5,5 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ

## Testovanie antibiotik



Obr. 13 Prežívanie listov odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom TDZ ( $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a hygromycínu ( $2,5-5 \text{ mg.l}^{-1}$ )

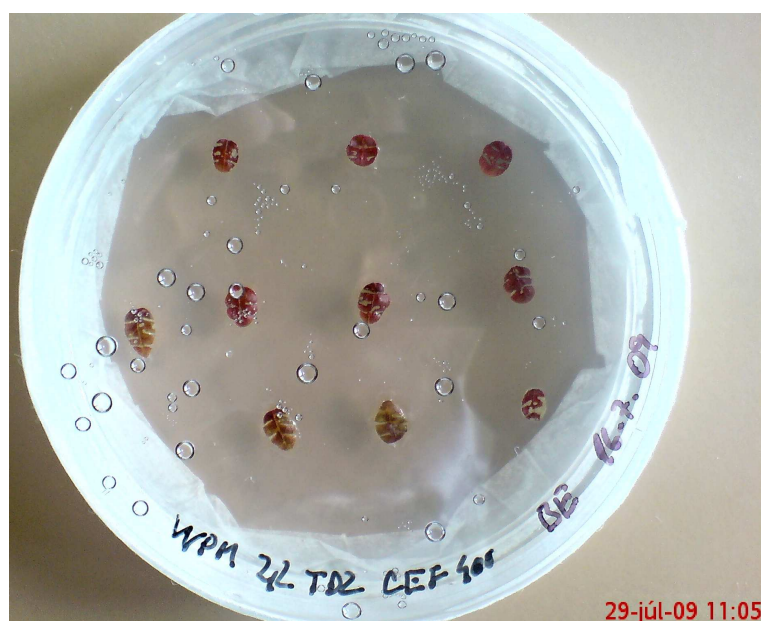


Obr. 14 Prežívanie listov odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom TDZ ( $2,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a hygromycínu ( $7,5-10 \text{ mg.l}^{-1}$ )





Obr. 16 Prežívanie listov odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom TDZ (2,2 mg.l<sup>-1</sup>) a cefotaximu (100 mg.l<sup>-1</sup>)



Obr. 17 Prežívanie listov odrody 'Berkeley' na médiu WPM s obsahom TDZ (2,2 mg.l<sup>-1</sup>) a cefotaximu (400 mg.l<sup>-1</sup>)

