

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

1132065

**REGENERÁCIA VYBRANÝCH DRUHOV DREVÍN
V PODMIENKACH IN VITRO**

2011

Ľudmila Kvasnicová

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

**REGENERÁCIA VYBRANÝCH DRUHOV DREVÍN
V PODMIENKACH IN VITRO**

(Bakalárska práca)

Študijný program:	Biotechnika parkových a krajinných úprav
Študijný odbor:	4121700 Krajinná a záhradná architektúra
Školiace pracovisko:	Katedra biotechniky park. a krajinných úprav
Školiteľ:	Marcel Raček Ing., PhD.

Nitra, 2011

Ľudmila Kvasnicová

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V
NITRE**

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Názov záverečnej práce: Regenerácia vybraných druhov drevín v podmienkach *in vitro*

Označenie záverečnej práce: bakalárska práca

Jazyk, v ktorom sa práca vypracuje: slovenský

Anotácia (nepovinné): Biologické princípy regenerácie drevín v podmienkach *in vitro*.
Vplyv hormonálnej regulácie na organogézu vybraných druhov drevín.
Vymedzenie druhovo podmienených rozdielov v reprodukčných postupoch.

Študent: Ľudmila Kvasnicová

Fakulta: Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva

Študijný program: biotechnika parkových a krajinných úprav

Študijný odbor: 4121700 krajinná a záhradná architektúra

Školiace pracovisko: Katedra biotechniky parkových a krajinných úprav

Fakulta: Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva

Školiteľ: Ing. Raček Marcel, PhD.

Konzultant:

Vedúci školiaceho pracoviska: prof.Ing. Paganová Viera, PhD.

Dátum schválenia: 3.11.2010

.....

podpis vedúceho školiaceho pracoviska

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Ľudmila Kvasnicová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Regenerácia vybraných drevín v podmienkach in vitro“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 25.Mája, 2011

.....

Abstrakt

Dreviny sa dnes častejšie pestujú vegetatívne ako generatívne, pretože vegetatívne rozmnožovanie prináša mnoho dôležitých výhod. Základným moderným spôsobom rozmnožovania je dnes pomocou kultivácie v podmienkach in vitro. Tu nastáva problém s typom kultivačného média, kôli ktorému vznikajú často zdĺhavejšie problémy, kým sa nastaví správna kombinácia koncentrácií. Cieľom práce bolo zistiť, ktoré podmienky musia byť splnené aby prebehlo regenerovanie v poriadku a v zásade aký typ média sa vyberá pre aký druh a od čoho to závisí. Obsah práce sa zväčšil o potrebné dodatočné informácie, čo sa týka fyziológie, regenerácie a histórie metódy in vitro. V konečnom dôsledku táto práca obsahuje dôležité informácie o spôsoboch regenerácie v podmienkach in vitro a východiská pre výber správneho kultivačného média pre množenie drevín.

Kľúčové slová: regenerácia, in vitro kultúry, propagácia drevín, mikropropagácia

Abstract

Nowadays is more preferred vegetative propagation instead of generative, mostly by trees, because of important advantages what vegetative propagation gives. Micropropagation of in vitro plants has many advantages over conventional vegetative propagation, which is difficult and considerably limited by seasonal growth in woody plants. Here comes problem with type of medium, which makes a really big difficulties because is hard to get the right combination of concentration hormones and other substances. Aim of this work was find out reasons which affects regeneration by choosing right medium. Content of work also expand because lots of complementary informations, physiology, regeneration and history of in vitro method. This work contains many important facts about different ways of regeneration in vitro conditions and principles that are most needed for choosing the right medium for propagation of trees.

Key words: regeneration, in vitro tissues, trees propagation, mikropropagation, cultures in vitro

Obsah

Úvod	1
1. Fyziologické predpoklady pre regeneráciu	3
1.1 Mechanizmus regenerácie	3
1.2 Typy regenerácie	4
1.2.1 Fyziologická regenerácia	4
1.2.2 Patologická regenerácia	4
1.3 Regenerácia v podmienkach in vitro	6
1.3.1 Typy reakcií explantátov v kultúre in vitro	7
1.4 Morfogenéza in vitro	8
1.5 Totipotencia, dediferenciácia, apoptóza	8
1.6 Regenerácia priama a nepriama	9
1.7 Organogenéza	10
1.8 Hormonálna regulácia	12
1.8.1 Fytohormóny	12
2. Rozmnožovanie in vitro	16
2.1 Metóda in vitro	16
2.1.1 História a vznik metódy in vitro	16
2.1.2 Základné rozdelenie in vitro kultúr	17
2.2 Rastlinné explantáty, ich význam a perspektíva využitia	20
2.2.1 Všeobecný postup meristémového množenia rastlín	21
2.2.2 Zloženie živných médií	22

Obsah

2.2.3 Kultivačné podmienky	24
2.3 Význam pletivových kultúr v šľachtení rastlín	25
3. Regenerácia drevín v podmienkach in vitro	29
3.1 Modely regenerácie drevín v podmienkach in vitro	29
3.2 Pagaštan konský – <i>Aesculus hippocastanum</i>	29
3.2.1 Regenerácia Pagaštana konského v in vitro podmienkach	30
3.3 Cyprušteľ tupolistý – <i>Chamaecyparis obtusa</i>	31
3.3.1 Regenerácia Cyprušteľa tupolistého v in vitro podmienkach	32
3.4 Lagerstroemia – <i>Lagerstroemia speciosa</i>	33
3.4.1 Regenerácia Lagerstroemie v in vitro podmienkach	33
3.5 Rozdielnosť a jej význam	37
3.5.1 Východiská pre určenie podmienok reg. drevín v pod. in vitro	38
3.6 Kultivačné nádoby, problematika s vitifikáciou	39
Záver	43
Zoznam použitej literatúry	44

1 Úvod

Dnes už je všeobecne známy postup akým sa dajú regenerovať rôzne okrasné rastliny, nie je to tak vzdialené ako v roku 1902 keď s tým ešte len experimentovali vedci ako napríklad Gottlieb Haberlandt. Neustále sa rozvíjajú nové a nové spôsoby ako použiť, vylepšiť médiá a ktorá rastlina na akom type média najlepšie regeneruje, príp. v akých podmienkach sa dá efektívne množiť aký druh.

Obširnosť témy nás postupne viedla ísť do jej hĺbky a preto sme sa snažili priblížiť, ako k celému procesu dochádza, aký prírodný mechanizmus za tým stojí a poukázať na rozdielnosť medzi regeneráciami drevín v podmienkach *in vitro*. Dnešný stav poznania je veľmi rozvinutý, mnoho poznatkov už je absolútne bežne zaužívaných. Jediným bodom neustáleho poznávania sú techniky pre najvhodnejší spôsob regenerácie a výber média, ktoré je vyhovujúce pre danú rastlinu.

Bohužiaľ tejto téme sa venuje veľmi malé množstvo ľudí, zostáva len na odborníkoch a nadšencov biotechnológií. Vývoj akým sa pohybuje pestovanie okrasných rastlín ukazuje, že v budúcnosti sa postupne prenesie väčšina technológií práve na spôsob regenerácie rastlín v podmienkach *in vitro*. Jej výhody jednoznačne dominujú pred nevýhodami. Už dnes sa touto technológiou dopestovávajú tisíce rastlín ročne po celom svete. Naším základným dominantom boli dreviny, ktoré takisto už idú v stopách trvaliek a cibuľovín.

Význam práve tejto práce spočíval v určení východisk, pre zostavovanie metód pre regeneráciu drevín v podmienkach *in vitro*. Kládli sme dôraz na postupné vniknutie do témy cez vrstvy. Prvou vrstvou bola fyziológia rastlín, veľmi dôležito obohatila túto prácu, pretože aj keď na prvý pohľad známe informácie, boli esenciálne pre podklad, pre pochopenie princípov. Ďalšou vrstvou sme sa nechali vniesť do histórie a vzniku tejto metódy *in vitro*, priblížili jej začiatky a dodali bližšie informácie o médiách. A v tretej najdôležitejšej časti už pojednávame o modelových drevinách. Ich rozdielnosť medzi sebou a východiskom pre dnešok. Táto práca prináša jednoduchosť a syntézu informácií, ktoré sú nevyhnutné pre pochopenie techniky a vývoja množenia v dnešnom svete. Zahradničeniu už nie je tak efektívne, aj keď prírodné bio výrobné technológie sa drú vpred, nestihnú a nikdy nedobehnú množstvo možností, ktoré prináša technika *in vitro*.

Táto téma ma uchvátila a preto som sa rozhodla do nej preniknúť. Poznanie drevín, trvaliek, cibuľovín či letničiek je stále len drobná časť oproti poznaniu možností ich produkcie. Na Slovensku ešte nie je vyvinutý spôsob ako by sa mohlo presadiť veľkovýrobné pestovanie domácich aj zahraničných druhov drevín, či okrasných kvetov. Budeme nútení odberať cudzokrajnné prevažne holandské semená a sadenice, kôli nedostatku trpezlivosti a zánietenia do produkcie. Pochopením celého procesu regenerácie drevín v podmienkach in vitro je možné pochopiť aj jeho jednoduchosť. Vďaka týmto informáciám som pochopila sama, koľko sa dá bádať a vytvoriť touto metódou. Sú to všetko možnosti ako tvoriť. Ako vyvíjať a využívať prírodné zdroje a možnosti k prospechu ľuďstva. Nie je to niečo nereálne ale fakticky funkčné už v mnohých vývojových krajinách. Hypotéza, akoby sme mohli zalesňovať obrovské plochy, dopestovávať zdravé nové zeleninové polia, len z minimálnych zdrojov, 10 rastlín nám postačuje, je pre mnohých ešte stále neuveriteľná. Z tohto hľadiska vidím, ako je nutné podporiť a šíriť tieto myšlienky čo najväčšiemu množstvu ľudí. Čím viac sa o tejto téme bude hovoriť, tým väčší úžitok nám prinesie.

Cieľ práce :

Definovať východiská pre zostavovanie metód regenerácie vybraných druhov drevín v podmienkach in vitro.

1 Fyziologické predpoklady pre regeneráciu

Základným predpokladom pre rozmnožovanie a produkciu rastlín sú poznatky z fyziologických procesov. Poznanie základných fyziologických mechanizmov pre každý typ, prípadne podobné druhy, nám umožňuje správne vybrať najvhodnejšiu variantu s najvyšším efektom pre nasledovné množenie. Práve regenerácia je aspekt, ktorý ovplyvňuje ako daný druh bude reagovať na náš vybraný spôsob regenerácie.

Potreba rastlín regenerovať je východiskom pre moderné vedecké metódy a jej experimentálny vývoj. Kde v poslednej dobe vládne vegetatívne rozmnožovanie pred generatívnym. Z tohto dôvodu sme nižšie popísali ako regenerácia funguje, prečo a jej prejavy v in vivo a in vitro podmienkach.

1.1 Mechanizmus regenerácie

Vlastnosťou všetkých živých buniek je ich schopnosť rásť a deliť sa. Rast u rastlinného organizmu prebieha v určitej etape vývinu, pričom organizmus prekonáva tri základné rastové fázy – embryonálnu (zárodočnú), prolungačnú (predlžovaciú) a diferenciacnú (rozlišovaciú).

V embryonálnej fáze, v ktorej sa tvoria meristematické bunky, dochádza k zmmoženiu počtu buniek, pribúdaniu cytoplazmy, ale nie k ich zväčšovaniu. Pri raste sa uplatňuje mitóza. Aktivitu delenia kontroluje samotný organizmus.

V predlžovacej fáze sa bunka zväčšuje, viacnásobne rastie jej objem, a to najmä v dôsledku dopĺňania vodou a v nej rozpustených živí (vzniká alebo zväčšuje sa v nej vakuola).

V diferenciacnej fáze získavajú bunky štruktúrnu i funkčnú špecializáciu, s čím súvisí už aj určitá usporiadanosť diferencovaných buniek do nadradených celkov. Diferenciáciou u vyšších rastlín sa viac – menej zakončuje trojfázový základný rastový proces, ktorý vyúsťuje do funkčnej zrelosti bunky. Proces diferenciacie prebieha na rôznych úrovniach :

- na úrovni celej rastliny – ide o diferenciaciu koreň – výhonok;
- na úrovni výhonku – sa diferencuje stonka – list – kvet;
- diferenciacia vnútri orgánu – bunka – pletivo.

V diferencovanej bunke sa vytvárajú už kompletne enzýmové systémy, ktoré zabezpečujú všetky metabolické funkcie. Špecializované bunky ne strácajú schopnosť delenia, je len korelačne potlačená účinkom zábranných vplyvov. (HUDÁK a kol.,1991).

Každá rastlinná bunka je totipotentná, tj. obsahuje kompletnú genetickú informáciu východzej rastliny. Zmenou podmienok je možné vyvolať remeristemáciu, dediferenciáciu a neorganizovaný rast už raz diferencovaných buniek. Dediferenciácie sú schopné všetky bunky, ktoré nedegenerovali. O schopnosti rastlinných buniek dediferencovať a tak obnoviť svoju totipotenciu, máme dostatok dôkazov. Názorným príkladom je jav regenerácie. (ZIMA a kol., 1997). Takýto proces prebieha aj pri poranení v špecializovaných, nedeliacich sa bunkách v blízkosti poškodeného miesta. Vplyvom tzv. ranovej reakcie sa pôvodne nedelivé bunky začnú opäť deliť a zaceľovať poškodené miesto parenchýmatickým pletivom, ktoré sa volá kalus. (ERDELSKÝ, FRIČ, 1979).

Nutná potreba rastlín regenerovať pri akomkoľvek poranení, či narušenia rovnováhy je východiskom pri regenerácií. Tento proces je prirodzeným javom každého živého organizmu. Regenerácia je nevyhnutná pre zachovanie životne dôležitých funkcií rastlín. A pre nás hrá dôležitú úlohu.

1.2 Typy regenerácie v in vivo podmienkach

1.2.1 Fyziologická regenerácia

Fyziologickou regeneráciou rozumieme náhradu stratených alebo odumierajúcich častí rastliny počas jej života, teda bez poranenia. Na jeseň listy opadávajú, pričom zanechávajú jazvu, ktorá sa hojí korkom. Z pupeňou potom vznikajú na jar nové listy. Na druhotne hrubnúcich orgánoch je pôvodný epidermis nahradzovaný peridermom. V periderme je často nahradzovaný starší korok novým v hlbších vrstvách primárnej kôry. Vrstvy kôry potom odumierajú a spolu s odumretým peridermom tvoria kôru (Procházka,et al.1998,Praha).

1.2.2 Patologická regenerácia

Pri patologickej regenerácií nastáva hojenie až po poranení. Rastliny sú neustále vystavované poraneniam, omnoho viac ako živočíchovia (Procházka,et al.1998,Praha).

Preto majú rastliny silnú regenerčnúä schopnosť a prejavuje sa mnohými spôsobmi: hojením rán, restitúciou, reprodukciou a regeneráciou v užšom slova zmysle.

Restitúcia a reprodukcia

Spôsobu regenerácie skúmal už na začiatku nášho stoloetia profesor Bohumil Němec (1905). Existuje zvláštna forma regenerácie, tzv. restitúcia, odrežeme nepatrnú časť koreňového apexu (cca 0,5mm), rez musí byť vedený v zóne pôvodného meristému. To znamená, že koreňový vrchol sa obnoví priamo na rane po odrezanom vrcholku. Najbližšie bunky k rane sa začnú deliť, tým vytvoria nový meristém, vrchol aj s novou koreňovou čapičkou.

Restitúcia nastane aj vtedy keď sa preruší korelácia medzi terminálnou časťou koreňovej špičky (promeristémom) a ostatným meristémom postraním zárezom, avšak opet' len do vzdialenosti asi 0,5 mm od vrcholu koreňa. Na rozdiel od restitúcie, kde ide o regeneráciu priamo na rane, existujú ďalšie dva typy regenerácie, kde ide o regeneráciu mimo rany. Tie nazývame reprodukcia a regenerácia v užšom slova zmysle. V prvom prípade nastáva regenerácia zo základov, ktoré boli prítomné už pred poranením, v druhom prípade zo základov, ktoré sa vytvárajú dodatočne, až po poranení. Reprodukcia je veľmi rozšírený typ regenerácie, kedy dochádza po poranení k obnove rastliny zo základou, ktoré boli predtým korelačne zadržované počas rastu. (Procházka, et al. 1998, Praha)

Regenerácia v užšom slova zmysle

K obnove stratených častí dochádza rastom zo základu rôznych vnútorných pletív príslušného orgánu (napr. z pericyklu alebo kambia) vytvorených až po poranení.

1. Regenerácia z koreňa

Keď odrežeme koreňu vrchol 1-2 mm dlhý, nedôjde už k restitúcií, ale z perikambia vyrastie zával kalusových buniek, z ktorých sa založia dva alebo viac vegetačných vrcholkov. Z nich neskôr jeden nabudne korelačnú prevahu.

2. Regenerácia zo stonky

Izolované úseky stonky napr. Salix alebo Populus vytvoria na apikálnom póle pupene a na bazálnom póle korene. Z kambia pňou vyrastá kalus, v ktorom sa často regeneruje obrovské množstvo pupenou vzhľadom k trvajúcemu stimulačnému vplyvu koreňového systému. Ide o veľkú poruchu celistvosti, pretože o raste rozhodujú svojimi regulačnými

vplyvmi len korene. Proti účinkom týchto stimulácií z koreňou začnú po určitej dobe pôsobiť inhibičné látky z dospelých listov, ktoré zabrzdia rast zprvu chaoticky regenerujúcich výhonov a obnovia celistvosť rastliny. Prejaví sa to tým, že niektoré výmladky zadržia rast iných a vytvoria nové kmene.

3.Regenerácia z listu

Možnosť regenerácie izolovaného listu závisí na jeho schopnosti žiť určitú dobu po izolácii, čo je pozitívne ovplyvnené svetlom, dostatočnou hydratáciou listu, jeho zásobením sacharidami, cytokinínom, príp. auxínom. Izolovaný list často vôbec nie je schopný regenerovať alebo u niektorých druhov regeneruje len koreňmi, nikdy nie pupeňmi. Tím sa len predĺži život listu cytokinínmi v týchto vytvorených koreňoch, ale nová rastlina nemôže vzniknúť. K dokonalej regenerácii celej rastliny dochádza spoľahlivo u listu *Begonia rex*. Auxin túto regeneráciu podporuje. A aj u mnohých iných rastlín dochádza k plnej regenerácii z listu(Procházka,et al.1998,Praha). Príkladnou ukážkou je práve *Begonia rex* ktorá zregerovala z jedinej epidermálnej bunky, ktorá bola poškodená rezom. Tento traumatický zásah zrušil zábranné korelatívne vzťahy okolitých buniek, čo umožnilo dediferenciáciu, následne obnovenie delivej schopnosti buniek, ich diferenciáciu a regeneráciu nového jedinca. Dokonca práve tieto poznatky dali základ myšlienke regenerovať z izolovanej bunky, alebo izolovanej časti rastlinného organizmu nové individuum (Procházka,et al.1998,Praha).

1.3 Regenerácia v podmienkach in vitro

V predchádzajúcich podkapitolách sme popísali princípi regenerácie ako obnovy porušenej celisvosti rastlín za normálnych podmienok (in vivo). Avšak od počiatku tohto storočia sú postupne využívané metódy, pri ktorých je možné skúmať regeneráciu izolovaných častí ratlín v umelých podmienkach. Prostredie, ktoré bolo dopredu zbavné mikroorganizmov, teda sterilné prostredie, umožňuje dlhodobo študovať vplyv kultivačných podmienok na izolované časti rastlín. Po umiestnení explantátu do kultivačných nádob nastávajú tieto reakcie:

- reakcia na poranenie, ku ktorému dochádza pri izolácii
- reakcia na stratu vplyvu celistvej rastliny

- reakcia na kultivačné podmienky

Poradie týchto reakcií je najprv také ako ich máme uvedené, ale veľmi skoro dochádza k vzájomným kombináciám a potom je ťažké určiť, čo je primárnou príčinou toho ktorého javu, ktorý v explantátovej kultúre prebieha. (Procházka, et al. 1998, Praha)

1.3.1 Typy reakcií explantátov v kultúre in vitro

Po umiestnení explantátov môže dôjsť v zásade týmto javom:

-rôzne rýchle odumretie

-dlhodobé prežívanie, pričom nedochádza k žiadnym zmenám, niekedy sa len zväčšuje objem kultivovaných pletív

-pokračovanie v pôvodnom vývoji a raste (typickým príkladom je kultura izolovaných koreňov)

-ďalší vývoj štruktúr, ktoré už boli založené pred izoláciou (za normálnych podmienok by niekedy zostali na celistvej rastline stále alebo dlhodobe inhibované len na úrovni základov).

Až po izolácii explantátov dochádza k vzniku základov rôznych štruktúr. Začína sa tvoriť kalus, teda pletivo, ktoré rastie neorganizovane bez zreteľnej polarite a usporiadania existujúceho v normálnej rastline, ale dochádza k diferenciácii buniek, takže vedľa buniek deliacich môžu v kaluse existovať parenchymatické bunky, xylémové elementy, zásobné bunky a ďalšie. Takýto kalus môže rásť pri pravidelnom prenášaní a čerstvé kultivačné médium a pri odstraňovaní odumretých buniek desiatky rokov.

K akému javu v podmienkach in vitro skutočne dôjde, závisí na celej rade faktorov. Vedľa kultivačných podmienok záleží aj na vlastnom explantáte. Vplyv explantátov formulovali na základe zhrnutia predchádzajúcich poznatkov Murashige (1974) a George a Sherrington (1984) takto:

a, orgán, z ktorého bol explantát izolovaný

b, fyziologické a ontogenetické štádium

c, obdobie odberov explantátov

d, veľkosť explantátu

e, kvalita donorovej rastliny

f, genotyp

g, orientácia explantátu

h, predchodzie pôsobenie na donorovú rastlinu

i, inokulačná hustota

Uvedené poradie nepredstavuje nijako poradie dôležitosti. Dnes sa považuje za jeden z rozhodujúcich faktorov genotyp. Práve u explantátových kultúr sa však veľmi názorne ukazuje vzájomná neoddeliteľnosť genetických a fyziologických zákonitostí, ale v tomto texte sa obmedzíme na konštatovanie, že všetky deje prebiehajúce pri kultivácii explantátov sú silne geneticky ovplyvnené. Aj keď si budeme v ďalšom texte všímať morfológických a fyziologických zákonitostí morfogénzy v explantátovej kultúre, musíme to mať neustále na pamäti. (Murashige, Skoog, 1962)

1.4 Morfogéza in vitro

Pod pojmom morfogéza sa rozumie vytváranie organizovaných štruktúr. V oblasti explantátových kultúr sa veľmi často používa ako synonymum pojem regenerácia, pretože sa v kultúre vytvárajú nové útvary, ktoré predtým neboli aspoň mikroskopicky pozorovateľné. Medzi regeneráciu v prirodzených podmienkach a regeneráciou in vitro existuje rada rovnakých rysov, avšak špecifické podmienky kultivácie navodzujú niektoré odlišnosti a procesy, ktoré sa v normálnych podmienkach vyskytujú iba zriedka alebo dokonca vôbec nie. (Procházka, et al. 1998, Praha)

1.5 Totipotencia, dediferenciácia, diferenciácia, apoptóza

Základným predpokladom regenerácie je totipotencia rastlinej bunky, t.j. schopnosť akejkolvek plnohodnotnej rastlinej bunky dať vznik akémukoľvek pletivu a celému organizmu. Od koncepcie totipotencie, ktorú formuloval Haberlandt (1902), sa odvíja celá história explantátových kultúr. Najtypickejšie sa táto vlastnosť prejavuje u zygoty, ktorá v sebe obsahuje celý organizmus, ktorý z nej postupne vzniká. U ostatných bunkách je predovšetkým dôležitá ich plnohodnotnosť.

Diferenciácia nesmie dosiahnuť taký stupeň, aby bola stratená alebo ireverzibilne inaktivovaná časť genetickej informácie, ktorá umožňuje práve vznik jedinca zo zygoty. Tuto vlastnosť vykazujú bunky embryonálne a meristemické, s minimálnym stupňom diferenciácie. Rada typov buniek diferencovaných je zároveň totipotentných. Niektoré bunky však túto vlastnosť stratili, ako napr. vodivé bunky v lyku, ktoré vôbec neobsahujú jadro. U niektorých buniek je zatiaľ obtiažne určiť, či vôbec už nie sú totipotentné v dôsledku už vysokej diferenciácie, teda už u nich prebehli ireverzibilné zmeny, alebo či doteraz neboli nájdené podmienky, ktoré by aktivovali informáciu, ktorá sa nemusí u danej bunky pri jej špecializácii prejavovať. K tomuto záveru vedú výsledky pokusov, ktoré ukázali, že aj vysoko špecializované bunky pokožky môžu byť základom celej rastliny, ako napr. ukázali Pheeters a Skirvin (1983). Inými slovami niektoré bunky sú totipotentné, ale ešte nie je známe, ako „spustiť“ túto ich vlastnosť.

Aby diferencovaná, plnohodnotná bunka mohla svoju totipotenciu prejavovať, musí najprv dôjsť k jej dediferenciácii. To znamená, že sa musí vrátiť štrukturálne aj funkčne na úroveň zygoty, bunky embryonálne alebo meristemické. Zjednoduší sa bunecné organely a predovšetkým sa obnovuje delenie. To samé o sebe ešte nestačí. Ak nie je delenie prísne organizované a nie je nastolená bunecná a neskôr aj orgánová polarita, nedôjde k vývinu organizovanej štruktúry, ale začne vznikáť iba kalus. Pre vznik celistvej rastliny je dôležité aj programované odumieranie buniek, ktoré prejavom je apoptóza. Napr. rada buniek vykonáva svoje funkcie až po vymiznutie protoplastu. Toto vymiznutie musí nastať v presne vymedzenom mieste, teda podľa určeného programu. Proces dediferenciácie nie je obmedzený len na explantátové kultúry. Typicky k nemu dochádza aj v celistvej rastline pri vzniku sekundárnych meristémov (Procházka, et al. 1998, Praha).

1.6 Regenerácia priama a nepriama

K regenerácii môže dochádzať priamo na izolovanom pletive buď zo založených základov, alebo de novo tak, že bunka alebo bunky, ktoré dediferencovali, sa začnú podieľať bezprostredne na vytváraní novej štruktúry. V oboch uvedených prípadoch sa jedná o regeneráciu priamu.

Inokedy delenie meristémových buniek vnesených spolu s explantátom alebo vzniknutých dediferenciácií vedie k najprv vytváraniu kalusu a potom až v takto vzniknutej kalusovej kultúre dôjde, väčšinou po zmene kultivačných podmienok, k regenerácii nových štruktúr. V tomto prípade sa hovorí o regenerácii nepriamej. Medzi pôvodnou organizovanou štruktúrou explantátov a novo vzniknutou organizovanou štruktúrou je teda kalusové štádium. (Kamenická, Rypák, 1989)

1.7 Organogenéza

Pri organogenéze vznikajú orgány alebo ich súbory. Nevzniká však bezprostredne celistvá rastlina. V mnohých prípadoch je k nej možné dôjsť ďalšími manipuláciami, a to zmenou kultivačných podmienok alebo po prenesení do podmienok normálnych. Tak napr. listové útvary a korene zostanú naďalej len tým, čím sú. Ak sa podarí navodiť regeneráciu pupeňov, výhonkov, ktoré sa z nich naďalej vyvíjajú, vedie ich zakorenenie k vzniku nového jedinca podobne ako pri zakoreňovaní odrezkov. (Dodds, Roberts, 1985)

Na rozhraní medzi prvou a druhou skupinou sú napríklad kvety, ktorých tvorbu je možné v explantátovej kultúre tiež navodiť. Po oplodnení môže dôjsť k vývinu zárodka aj semena a touto cestou k vzniku celistvej rastliny. V tomto vzácnom prípade však na proces organogézy navodzuje proces embryogenézy.

Pri organogenéze sa nová štruktúra môže vyvíjať z jednej alebo i viac buniek. O tejto otázke boli svojho času vedené spory, aj keď už pokusy, ktoré previedol Winkler (1912), ukázali, že na regenerácii výhonkov sa môže podieľať aj viacej buniek. V uvedených pokusoch bol výhonok *Solanum nigrum* v normálnych podmienkach navrúbl'ovaný do rozštepú podnože *Lycopersicon esculentum*. Po zraste vrúbl'ú s podnožou bol vrúbel' zrezaný tak, aby v pôvodnom rozštepe podnože zostal klin pletiva vrúbl'ú. Adventívne výhonky, ktoré sa vytvorili na rozhraní pletív v podnoži a vrúbl'ú, predstavovali sektoriálne a perikálne chiméry. Tak bol jasne preukázaný ich viacbunečný pôvod, pričom mechanizmus, ktorým vznikali, sa v podstate nelíši od organogenézy in vitro.

Aj v podmienkach in vitro bol obdobný dôkaz prevedený na rastlinách z rovnakej čeladi. Pri kultivácii kalusu odvodeného z rastliny *Nicotiana tabacum* spoločne

s kalusom hybridu *N. glauca* x *N. lagsdorffii* regenerovali výhonky, ktoré boli dopestované v celistvé rastliny. Morfológia a hustota trichómov na pokožke, potomstvo po samoopelení a regenerácií v kultúre odvodenej z drene dokázali, že regeneranty boli perikálnymi chymérami (Carlson a Chaleff 1975). Na druhej strane bolo pri pokusoch s chimérickými jedincami dokázané, že nie je vylúčená ani organogéza z jednej bunky (Abu-Qaoud et al. 1990).

Na priebeh organogézy majú samozrejme vplyv kultivačné podmienky, predovšetkým zloženie kultivačného média. Z jeho zložiek sa potom významne uplatňujú rastové látky. Pri organogéze viacmenej platí pravidlo, ktoré zistili Skoog a Miller (1975). Podľa tohto pravidla sa uplatňuje v rozmedzí fyziologických koncentrácií pomer, v akom sú v médiu prítomné cytokiníny a auxíny. Ak je tento pomer väčší ako jedna, teda prevažujú cytokiníny nad auxíny, dochádza k regenerácií výhonkov. Pri opačnom pomere dochádza k regenerácií koreňov. To platí pre organogézu priamu aj nepriamu. Ak je koncentrácia cytokinínov a auxínov približne rovnaká, teda je ich pomer cca jedna, dochádza u primárnych explantátov k tvorbe kalusu. Kalusová kultúra pokračuje normálne vo svojom raste, a pritom nedochádza k regenerácií. Toto pravidlo má radu výnimiek. Dôležitá je aj konkrétna rastová látka, ktorá sa uplatňuje. Napríklad kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová, teda látka auxínovej povahy s veľmi silným účinkom veľmi často indukuje tvorbu kalusu aj pri odpovedajúcom pomere s cytokinínom. Tu sa uplatňuje skôr aktivita danej látky než jej koncentrácia. Teda pre látky, ktoré majú približne podobné koncentrácie, uvedené pravidlo platí, pri látkach, ktoré sa svojimi optimálnymi koncentraciami príliš líšia, sa uplatňuje viac ich aktivita. (Procházka, et al. 1998, Praha).

Pri organogéze, ku ktorej dochádza zo základov, ktoré sa vyvinuli pred odberom explantátov, sa uplatňujú podobné zákonitosti ako na intaktnej rastline. Tak je tomu v prípade izolovaných apikálnych či axilárnych meristémov, u ktorých cytokinín potlačuje apikálnu dominanciu, a tak vyvoláva okamžitú tvorbu postranných vetví z práve založených axilárnych meristémov.

Organogézou môžu vzniknúť v podstate akýkoľvek orgán rastliny – koreň, výhonok, list, kvet. U tých druhov, kde sa orgány tvoria za normálnych podmienok, je možné navodiť aj vznik zásobných orgánov – cibulí a hl'uz. Tie vznikajú in vitro buď na bázi regenerovaných výhonkov alebo bezprostredne na kultivovanom explantáte – segmentu zásobného listu z cibule, normálneho listu, výhonku, kvetenstva, niekedy aj piestika.

Väčšinou sa jedná o regeneráciu priamu. Vzniklé zásobné orgány samozrejme dosahujú menšie veľkosti než v prirodzených podmienkach, a preto sú označované ako cibulky a mikrohl'uzky.

Z praktických dôvodov bola tejto otázke venovaná pozornosť, pretože regenerované zásobné orgány zjednodušujú prenos do normálnych podmienok, a preto sa s nimi pracuje ako s normálnymi cibulami alebo hl'uzami.

Napríklad u *Solanum tuberosum* vznikajú mikrohl'uzy priamo z axilárnych pupeňov. O ich vzniku rozhoduje zloženie kultivačného média – vyšší obsah sacharózy a prítomnosť kyseliny abscisovej ich tvorbu stimuluje.

Pre orchideje je charakteristické, že sa z embrya ktoré je veľmi jednoduché, za normálnych podmienok vyvíja protokorm. Táto špecifická štruktúra má obvykle guľatý alebo valcovitý tvar a vyvíjajú sa na nej rizoidy. Až po dosiahnutí určitej hmotnosti sa na protokorme začne vyvíjať vlastná rastlina. Pri kultivácii in vitro dochádza k vývoju protokormu nie len zo zárodokov ale aj v orgánovej, napr. meristémovej kultúre. Pozoruhodné je, že sa táto štruktúra môže v umelých podmienkach aj samostatne množiť. Rastliny potom vznikajú až po prenesení na iné kultivačné médium, resp. do iných kultivačných podmienok. (Procházka, et al. 1998, Praha)

1.8 Hormonálna regulácia

Už od konca minulého aj počiatku nášho storočia sa rast vysvetľoval prevažne v súvislosti s procesom výživy. No nemecký botanik Julius von Sachs (1832-1897) vyslovil domnenu o existencii chemických signálov (tzv. morfogény), ktorými môžu vzájomne komunikovať jednotlivé orgány rastlín. Obecne ich dnes nazývame regulátormy rastu. Tento názov neodlišuje látky prirodzené a syntetické. Prirodzené regulátory rastu rozdeľujeme do dvoch skupín: rastlinné hormóny (fytohormóny) a ďalšie látky s regulačnou aktivitou. V staršej literatúre boli delené na inhibítory a stimulanty, ale dnes už vieme, že každá látka v určitej koncentrácii môže mať iné účinky aj inhibujúce aj stimulačné. Preto sa dnes už toto delenie veľmi nepoužíva. (Yadav, Tyagi, 2006)

1.8.2 Fytohormóny

Rastlinné hormóny sa líšia od hormónov živočíšnych v mnohých aspektoch. Rastliny nemajú špecifické žľazy s vnútornou sekréciou, ktoré by hormóny vytvárali, a väčšina fytohormónov je syntetizovaná na viacerých miestach v rastline. Koncentračná závislosť účinku fytohormónov nie je tak zrejímavá ako u hormónov živočíchov a môže sa pohybovať od stimulácie k inhibícií rastovej reakcie. Základne delenie fytohormónov je: a, endogénne fytohormóny, látky s regulačnou aktivitou b, exogénne aplikované rastové regulátory

Mechanizmus účinku fytohormónov je viazaný na receptory (bielkoviny). Hormón sa môže viazať na receptor umiestnení na membráne a signál je potom ďalej do bunky prenášaný systémom druhého posla (second messenger) alebo preniká do bunky, viaže sa na rozpustný receptor v cytoplazme a takto vzniknutý komplex preniká do jadra, kde vyvoláva zmenu expresii niektorých génov. U rastlín bolo dodnes popísaných mnoho bielokovín schopných naviazať fytohormóny, či membránových alebo cytoplazmatických. S výnimkou jedného receptora pre auxín sa však u žiadnej z nich nepodarilo prekázať receptorovú funkciu, čo je dôvodom toho, že sú obvykle nazývané väzbové miesta. Ako všetky hormóny sú aj fytohormóny látkami, ktoré sa vyskytujú v malých množstvách a sú účinnými nositeľmi signálov. Miesta ich vzniku a účinku sú rozdielne. Transport z miesta vzniku na miesto pôsobenia sa deje pomocou vodivých zväzkov rastlín, v niektorých prípadoch však pôsobia fytohormóny v samotnom mieste vzniku. Nepatria ani k stavebným ani výživným látkam, nie sú teda stavebným materiálom alebo zdrojom energie pre rastlinné bunky. Rastlinné regulátory sú účinné v koncentráciách 10^{-6} mol. l^{-1} menej.

O mechanizme regulačného účinku rastových látok existuje niekoľko hypotéz, z ktorých vyplýva, že účinok rastových látok je sprostredkovaný:

1. prostredníctvom druhotných mediátorov (cAMP, Ca^{2+} , etylén),
2. bez prostredníctva druhotných mediátorov, keď rastová látka pôsobí primárne a ovplyvňuje rôzne procesy, napríklad využitie iónov kovov, ktoré sú aktivátormi rôznych základných enzýmov,
3. v regulácii rastovej reakcie rastlín na zmenené vonkajšie podmienky prostredia (jarovizácia, fotoperiódá), ktoré ako vonkajšie faktory

v interkcii s rastovými látkami riadia ontogenézu a rastové procesy rastlín. (Erdelský, Frič, 1979)

Endogénne fytohormóny: auxíny, cytokiníny, gibberelíny, kys. abscisová, etylén

Látky s regulačnou aktivitou: brassimostereoidy, polyamidy, kys. jasmonová, oligosacharidy, fenolické látky

Auxíny sú látky indolového typu. Prekurzorom v ich biosyntéze je tryptofán a k syntéze dochádza prevažne vo vrcholových meristémoch a v mladých častiach rastlín. K natívnym auxínom patrí kyselina β -indolyloctová (IAA) a kyselina fenyloctová (PAA), k syntetickým auxínom zaraďujeme kyselinu β -indolylmaslovú (IBA), kyselinu α -naftylactovú (NAA) a kyselinu 2,4-dichlórfenoxyoctovú (2,4-D). Mechanizmus pôsobenia auxínu sa prejavuje v dvoch základných účinkoch, a to v iniciácii rastu, pričom je spojený s funkciou cytoplazmatickej membrány a s funkciou jadra (nukleových kyselín, bielkovín a enzýmov). Ich prítomnosť je nutná pre indukciu kalusu, 2,4-D najúčinnšie indukuje tvorbu kalusu v explantátových kultúrach. Účinky auxínov sa prejavujú v morforegulačnom ovplyvnení jednotlivých orgánov alebo celej rastliny, t.j. v procesoch, ktoré sú základom morfogénny (delenie, rast, diferenciácia). Majú význam pri predlžovaní buniek, apikálnej dominancii, raste koreňa a zakoreňovaní odrezkov (tvorbe adventívnych koreňov), kvitnutí dlhodenných rastlín, urýchlení transportu vody od bunky k bunke, fototropizme a geotropizme, činnosti kambia. (Yadav, Tyagi, 2006)

Gibberelíny sú látky diterpénovej povahy odvodené od kyseliny mevalónovej. Označujú sa $GA_1 - GA_n$. V rastlinách sa najčastejšie vyskytuje kyselina gibberelová (GA_3). Ovpľvňuje delenie a predlžovanie buniek, klíčenie semien, kvitnutie a dormanciu. Stimulujú tvorbu hydroláz, proteáz a ribonukleáz.

Cytokiníny sú odvodené od purínovej bázy adenínu. Z natívnych cytokinínov sú najznámejšie zeatín, izopentenylaminopurín (IPA) a 6-benzylaminopurín (BAP). Zo syntetických sú to benzyladenín (BA), 6-furfurylaminopurín (kinetín) a tetrahydropyranil-benzyladenín (PBA). Cytokiníny podporujú delenie buniek, brzdia rozpad DNA a RNA, stimulujú syntézu bielkovín a spomaľujú starnutie rastlín. Kombinácia auxínov a cytokinínov sa často využíva pre vyvolanie organogenézy v orgánových a kalusových kultúrach.

Kyselina abscisová (ABA) je terpenoid blízky vitamínu A a môže byť odvodený z mevalónovej kyseliny. ABA inhibuje rastové procesy, syntézu bielkovín a nukleových kyselín. Je považovaná za antagonistu giberelínov. Navodzuje odpočinok semien, hľúz a púčikov, opadávanie listov a plodov, brzdí predložovací rast (subapikálnych segmentov koleoptil), urýchľuje starnutie a znižuje transpiráciu uzavretím prieduchov.

Etylén vzniká vo vyšších rastlinách a vo väčšine nižších rastlín z aminokyseliny L-metioninu. Ako prvý medziprodukt vzniká S-adenozylmetionin (SAM), ktorá je v ďalšej reakcii premenená na kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC) a metyltioadenozin. Premena SAM na ACC je katalyzovaná enzýmom ACC-syntázou. Má krátku životnosť a v in vitro je značne nestály. Je to jediný plynňý hormón. Dokáže sa uvoľniť do atmosféry a ovplyvniť aj ďalšie rastliny v okolí. Inhibuje predlžovací rast, najvýznamnejší účinok etylénu je stimulácia dozrievania niektorých plodov, aj opad listov a brzdí transport auxínov. (Yadav, Tyagi, 2006)

Z látok s regulačnou aktivitou sú najvýznamnejšie **fenolické látky** patria k natívnym inhibítorm s antagonistickým účinkom. Vyskytujú sa v rastlinách v rôznych derivátoch – deriváty kyseliny hydroxybenzoovej, deriváty kyseliny salicylovej a škoricovej, deriváty kumarínu, kyselina jasmonová a flavonoidy. Ranové pletivo, ktoré vzniká in vivo, je presýtené fenolickými látkami, a tak sa jeho bunky prestávajú deliť a hynú. Fenolické látky inhibujú predlžovací rast subapikálnych segmentov koleoptíl a vplyvajú na dormanciu púčikov semien a hľúz. Pozitívny účinok majú na tvorbu adventívnych koreňov a na zakoreňovanie odrezkov. (Erdelský, Frič, 1979)

Rastové regulátory

Rastové regulátory sú synteticky vytvorené hormóny, ktoré sa exogénne dodávajú priamo do rastlinných médií a podporujú potrebné procesy, ako napr. indukciu rastu kalusu, koreňovej sústavy a pod. Sú to nasyntetizované endogénne fytohormóny. (viď vyššie auxíny, cytokiníny, giberelíny, kys. abscisová, etylén a látky s regulačnou aktivitou.)

Vonkajšie podmienky ovplyvňujúce rast

Teplota - ovplyvňuje klíčenie a jednotlivé fázy rastu rastlín, celkovú intenzitu metabolizmu (teda aj fotosyntézu a dýchanie). Jednotlivé druhy rastlín z rôznych klimatických pásiem majú rozdielne nároky na teplotu (rastliny teplobytné / chladnobytné). Každá rastlina má svoje teplotné minimum, pri ktorom prestáva rásť, podobné maximum a optimum, pri ktorom rastie najlepšie (rastliny mierneho pásma okolo 35°C). Niektoré viacročné rastliny alebo ich vývojové štádiá (semená, pupene) vyžadujú vo svojom životnom cykle periódu nízkych teplôt – vystavenie tejto perióde – jarovizácia (vernalizácia)- napr. u rastlín mierneho pásma zabraňuje predčasnému rašeniu pupeňov a ich následnému zmrznutiu – je teda dôležitým prispôbením sa ekologickým podmienkam prostredia.

Svetlo - je nutné pre fotosyntézu zelených rastlín (nezelené rastliny rastú aj za tmy), nástup jednotlivých fáz rastu... Dôležitá je kvalita svetla = jeho spektrálne zloženie (vlnové dĺžky pohlcované fotosyntetickými farbivami), podobne kvantita svetla (intenzita a doba osvetlenia). Pri nedostatku svetla sú rastliny bledé (málo chlorofylu), vyťahujú sa do diaľky a málo sa vetvia, poliehajú až hynú. Nároky jednotlivých rastlín sú rôzne – jednak na intenzitu svetla (svetlobytné / tieňobytné), jednak o dĺžku fotoperiód. (Dlhodenné, krátkodenné, neutrálne).

Voda – ovplyvňuje celkový rast a vývoj, metabolizmus rastlín.

Živny – nutné výživové látky

Znečistenie okolia – napr. SO₂, H₂S, fluór, ťažké kovy, prašný spad (ucpáva prieduchy), zasolenie vozoviek, pesticídy, ropné látky a pod. (Hermann, 2007)

2. Rozmnožovanie in vitro

2.1 In vitro

V posledných rokoch vystupuje stále viac do popredia práve metóda in vitro. Je to biologický proces uskutočňovaný mimo bunky alebo organizmu, to znamená v skúmavke, v laboratórnych podmienkach. In vitro (latinsky), znamená „v skle“. Je to vegetatívny spôsob rozmnožovania, ktorý veľmi efektívne nahrádza nie len generatívne rozmnožovanie ale aj ostatné bežné spôsoby vegetatívneho rozmnožovania. Špecifickým spôsobom, pomocou rastlinných explantátov, môžeme dosiahnuť veľké množstvo nových rastlín z jednej materskej rastliny.

2.1.1 História a vznik metódy in vitro

V roku 1838 Schwann a Schleider objavili a vyslovili teóriu, že bunky sú v zásade autonómne a regeneráciou sú schopné obnoviť celý organizmus. Táto vlastnosť sa nazýva totipotencia. Vyplýva zo skutočnosti, že všetky somatické bunky daného jedinca majú v princípe rovnaké genómové vybavenie, obsahujú celú genetickú informáciu a fyziologicky aparát potrebný k tvorbe celistvého organizmu. Pri vhodných výživných a vnútorných podmienkach pestovania môžeme navodiť expresiu reprimovaných génov, pôsobiacu ako indukčný stimul ďalšej morfogenézy.

Teória sa stala odrazovým mostíkom rastlinných bunkových a pletivových kultúr. Prvé pokusy rakúšana, Gottlieba Haberlanda v roku 1902 s rastlinnými pletivovými kultúrami technicky nevyšli. V 20-tich rokoch boli vyvinuté in vitro techniky rôznych tipov kultúr, napr. kalusová kultúra, orgánová kultúra, atď. Prvú rastlinnú pletivovú kultúru získali v roku 1939 Nobecourt, Gautheret a Phillip R. White z vrcholových odrezkov z paradajky.

Po 2. svetovej vojne sa oblasť in vitro pletivových kultúr začala rýchle rozvíjať vďaka objavu rastlinných hormónov. Prvý bol objavený auxín IAA, v roku 1955 kinetín (cytokinín) a potom ďalšie. In vitro techniky kultivácie rastlín sa najskôr začali rozvíjať a používať vo Francúzsku a USA a potom v ďalších krajinách. Využívali sa v rastlinnej fyziológii, poľnohospodárstve, záhradníctve, botanike, molekulárnej biológii, biochémií, patológii a iných vedných odboroch. (Bhojwani, Razdan, 1996)

Dnes sa široko používa pestovanie pletív a orgánov na umelých substrátoch. V záhradníckej praxi rozšíreným spôsobom vegetatívneho rozmnožovania je pestovanie rastlín z vegetačných vrcholov (vrcholových meristémov). Táto metóda sa zmenila na veľkovýrobnú technológiu, lebo je pri rozmnožovaní celého radu skleníkových rastlín nielen ekonomicky výhodná, ale zabezpečuje aj ochranu proti virózam a iným ochoreniam, ktoré sa práve vegetatívnym rozmnožovaním rozširujú. Sú to postupy vegetatívneho rozmnožovania založené na zistení, že rastliny majú obrovskú schopnosť regenerácie. Teoreticky, ale na základe početných úspešných pokusov, je možné dosiahnuť regeneráciu celej rastliny z jej častí na úrovni orgánu, pletiva, dokonca z jednej izolovanej bunky.

V súčasnosti je vypracovaný celý rad technologických postupov umožňujúcich množenie veľkého množstva druhov a kultivarov okrasných a úžitkových rastlín. Podľa medzinárodných štatistik len v Holandsku bolo v roku 1995 vyrobené použitím metód meristémového množenia v podmienkach in vitro niekoľko milión rastlín. (Pierik, 1987). Využíva sa základný knowhow vyvinutý do rokov 60tich. Do dnes je to nekončiaci proces vývoja. Biologické reaktory v tekutých médiach môžu byť statické alebo rozrušené. A práve za najväčšou nevýhodou sa dnes považuje pri tekutých médiach hyperhydricita. Základnou príčinou je premokrenie apoplastu. V rokoch 1970 a '80, somatická embryogenéza z bunkových suspenzií bola považovaná za budúcu cestu vegetatívneho rozmnožovania, ktoré by nahradilo rozmnožovanie pomocou odrezkov. Objavujú sa časté diskusie na túto tému. Veľmi rozdielnou alternatívou pre dnešné mikropropagácie je fotoautotropická propagácia. (Propagation of ornamental plants, vol.10, 2010)

2.1.2 Základné rozdelenie in vitro kultúr

1.Techniky, umožňujúce krátkodobé, resp. Dlhodobé uchovávanie rastlín v kultúre in vitro bez významnejších zmien pre potreby vegetatívneho množenia

2.Techniky indukcie genetickej variability najčastejšie využívané ako krátkodobý medzistupeň konkrétnej šľachtiteľskej metódy

Techniky zachovávajúce pôvodný genotyp:

- meristémové kultúry
- embryokultúry

·klonovanie in vitro

Techniky zachovávajúce pôvodný genotyp:

a; meristémové kultúry: meristém pre založenie kultúry in vitro definovali už dávno ako štruktúru, obsahujúcu vlastný apikálny meristém s 1-2 párami listových primordií. Pre tento typ kultúry sa bežne používa označenie meristémová kultúra. Pre rast izolovaných meristémov sú vhodné najbežnejšie kultivačné médiá ako B5, MS (Murashige, Skoog, 1967) Na médiách bez pridania rastových regulátorov sa vyvíja z meristému jeden výhon. Veľký vplyv na vývin meristémov majú cytokiníny. Odstraňujú inhibičný účinok apikálneho vrcholu na axilárne púčiky a stimulujú ich rast, meristémová kultúra potom nadobúda charakter mnohonásobných výhonkov. Najpoužívanejší cytokinín je BAP(6-benzylaminopurín), ktorý je najčastejšou zložkou kultivačných médií vo fáze novovytvárania buniek (proliferácia) Nesmierne cenným výsledkom meristémových kultúr je eliminácia vírusových ochorení. Platí všeobecná zásada: čím je menší explantát, tým je vyššia pravdepodobnosť získania zdravého jedinca. Produktom meristémovej kultúry je fenotypovo, homogénne a geneticky stabilné potomstvo.

(Obr.1,Meristémové kultúry, indukcia kalusu v pravo).



b; embryokultúry: Raghavan (1980) rozdelil embryokultúry do dvoch kategórií:

- 1.Kultúra semenných embryí, při ktorej sa ako explantát používa plne vyvinutá bipolárna štruktúra, obsahujúca koreňový aj stonkový meristém
- 2.Kultúra proembryí, čo je kultivácia všetkých nezrelých zárodokov ešte pred vyvinutím kotyledonov.

Zásadný rozdiel spočíva v tom, že staršie embryá sú po vyvinutí kľúčnych listov autotrofné, kým obyčajné proembryá sú heterotrofné. Tento fakt sa prejaví aj v kultúre.

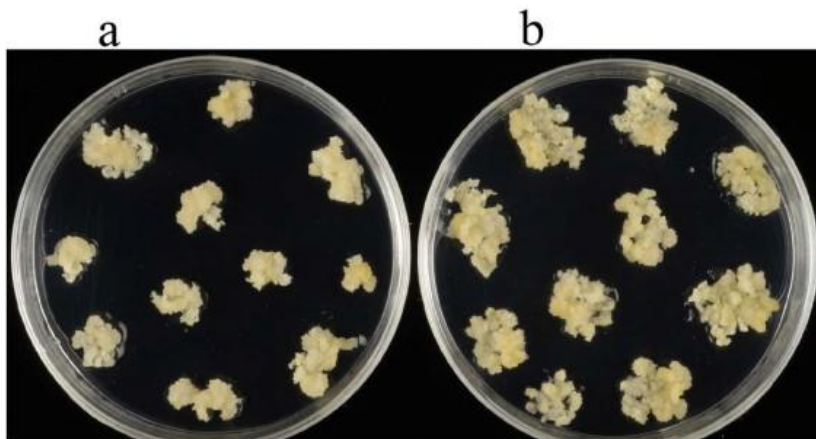
Staršie embryá majú nižšie nároky na zloženie kultivačného média. Plne vyvinuté embryá sú schopné klíčiť na veľmi jednoduchých médiách /minerálne soli a sacharóza/. Mladšie embryá vyžadujú vyššiu osmotickú hodnotu média, napr. Globulárne ľanové proembrya až 12% sacharózy. (Pierik, 1987)

Podľa Pierika (1987) embryokultúry slúžia na :

- elimináciu absolútnej inhibície klíčenia
- skrátene šľachtiteľského cyklu skrátene, či vylúčením obdobia dormancie
- prevencia aborcie embryí
- vegetatívne rozmnožovanie

(Obr.2, Embryokultúry, tvorba kalusu s embryý)

a, médium štandardné, b, médium obohatené 5 μ M CuSO₄.



c; klonovanie in vitro: označuje sa aj ako mikropropagácia. Rozmnožovanie in vitro prebieha:

a/ indukciou axilárnych meristémov pri kultivácii izolovaných vrcholov /meristémové kultúry/

b/ tvorbou adventívnych meristémov a púčikov pri kultivácii orgánov alebo ich častí

c/ diferenciaciou rastlín procesom organogenézy alebo somatickej embryogenézy v podmienkach kalusových a bunkových kultúr.

Klonovanie in vitro rozdelil Murashige (1978,1979) do štyroch fáz (2-5), no neskôr sa ku nim pridala i ďalšia fáza (1) často označovaná aj ako nultá :

1.zahŕňa prípravu východiskového materiálu v optimálnych pestovateľských podmienkach, s radou fytošantárnych opatrení

2.izolácia explantátu a jeho zavedenie do kultúry in vitro .Jej úlohou je zabezpečiť

nekontaminovaný rast a vývin explantátu

3.vlastné rozmnožovanie – hlavným zmyslom tejto fázy je doceliť masové rozmnoženie bez straty genetickej stability, výber pracovnej metódy sa prispôsobuje rastlinnému druhu a explantátu

4.ukončenie tvorby axilárnych výhonkov, ich predlžovanie a zakoreňovanie.

Zvýšená intenzita svetla je príprava výhonkov a rastlín z predchádzajúcej fázy na prenos do pôdy. Obsahuje významným adaptačným faktorom pre prechod od heterotrofnej k autotrofnej výžive

5.prenos rastlín do nesterilných podmienok a ich dopestovanie v pôde

Techniky zvyšujúce genetickú variabilitu

Bunky trvalých pletív explantátu izolované z celistvej rastliny a prenesené na kultivačné médium sa po určitej adaptačnej fáze začnú deliť. Mitotické delenie je obmedzené len na povrchové vrstvy buniek. Proces pri ktorom diferencované bunky trvalého pletiva prechádzajú do meristematického stavu sa považuje za dediferenciáciu. Výsledkom dediferenciácie in vitro je vytvorenie heterogénneho systému, ktorý má schopnosť spätnej diferenciácie na organizovanú štruktúru.

Kalusové pletivo, bunková kultúra i protoplastová kultúra je vlastne neorganizovaná explantátová kultúra. Je to nerovnorodý systém zložený z buniek rôzneho stupňa diferenciácie, s rozličnou morfogenetickou kompetenciou a rôznou reakciou na vonkajší morfogenetický signál (Pierik, 1987)

Medzi techniky rozširujúce genetickú variabilitu patria :

a; kalusové kultúry: kalus možno indukovať z každého druhu pletiva rastliny.

Primokultúra sa najčastejšie kultivuje na médiu s prídavkom auxínov, alebo cytokinínov. V ďalších pasážach sa používa to isté médium ale so zníženou koncentráciou fytohormónov. Kalusy sa podľa zdroja primokultúry, druhu kultivačného média sa môžu líšiť vzhľadom, kvalitou a farbou.

Kalus – pletivo, ktoré rastie neorganizovane bez zreteľnej polarita a usporiadania existujúceho vo vyvinutej rastline, ale dochádza k diferenciacii buniek

b; bunkové /suspenné/ kultúry: zakladajú sa z tzv. rozpadavých kalusov, prenesených do tekutého kultivačného média

c; protoplastové kultúry: protoplasty sa získavajú z rôznych typov pletív rastlín a

kultúr ich vystavením pôsobeniu celulytických a pektolytických enzýmov. Každý kultivovaný protoplast vytvorí po odstránení enzýmov bunkovú stenu. Bunky sa začnú deliť, každý protoplast vytvorí kolóniu intaktných buniek, z ktorých vznikne embryoid alebo mikrokalus a neskôr kalus

2.2 Rastlinné explantáty, ich význam a perspektívy využitia

Rastlinný explantát je každý fragment živého pletiva, celý orgán alebo komplex orgánov, odobratý buď z intaktnej rastliny alebo už z existujúcej kultúry s cieľom pestovať ho v podmienkach *in vitro*, t.j. v podmienkach definovaných po stránke chemickej aj fyzikálnej a zabraňujúcich nežiadúcej kontaminácii cudzorodými živými organizmami a bunkami.

2.2.1 Všeobecný postup meristémového množenia rastlín

Po uvážení všetkých spôsobov regenerácie v podmienkach *in vitro*, sme sa rozhodli priblížiť bližšie postup meristémového množenia rastlín. Z dôvodu, že je najviac využívaný a najbežnejší u všetkých rastlinných druhoch, aj u drevín. Oproti klonovaniu *in vitro* alebo embryonálnemu množeniu, ktoré sú omnoho náročnejšie aj na laboratórne podmienky aj na odbery je meristémový typ veľmi jednoduchý a v dnešnej dobe pre jeho efektívnosť a výhodnú nákladovosť veľmi obľúbený aj u veľkovýrobných firmách pre množenie okrasných rastlín a drevín v mnohých krajinách. Nižšie je popísaný stručný postup ako prebieha.

Proces meristémového množenia rastlín môžeme rozdeliť do niekoľkých etáp:

1. Prvou, etapou je výber matičného materiálu. Potrebujeme vybrať jedince s požadovanými vlastnosťami a v dobrom zdravotnom stave.
2. Potom nasleduje odvodenie sterilnej primokultúry. Východným materiálom sú explantáty, odobraté z meristémových zón matičnej rastliny. V optimálnom prípade treba urobiť test na kontaminovateľnosť vírusmi (napr. ELISA test). V prípade, že test na prítomnosť vírusovej nákazy je negatívny, môžeme odoberať z materskej rastliny celé puky s rastovými vrcholmi, prípadne aj

s časťou nodálneho úseku stonky. V prípade, že test bol pozitívny a nemáme možnosť získať zdravých jedincov, nasleduje proces ozdravovania. Ten je založený na predpoklade, že vírusová nákaza len postupne prerastá do novovytvorených vrstiev meristematických nekontaminovaných buniek rastového vrcholu. V takomto prípade k odvodu primokultúry môžeme odobrať iba najvrcholnejšiu zónu rastového vrcholu, u ktorej je predpoklad, že k nákaze vírusom ešte nedošlo. Pritom celý proces ozdravovania je treba priebežne kontrolovať testovaním rastlinného materiálu na prítomnosť vírusového ochorenia. Pri vlastnom odvodzovaní primokultúry je potrebné odobraté explantáty zbaviť všetkých mikroorganizmov a húb máčaním v sterilizačných roztokoch. Pritom treba postupovať veľmi opatrne a voliť koncentráciu ako i čas pôsobenia sterilizačných činidiel tak, aby došlo k absolútnemu zničeniu mikroorganizmov a húb pri zachovaní vitality sterilizovaných explantátov.

3. Po získaní prvých sterilných explantátov je potrebné otestovať vhodné multiplikačné živné médium. Pre komerčné účely je potrebné také zloženie multiplikačného živného média, na ktorom môžeme získať z jednej rastliny za jeden mesiac minimálne päť nových rastlín (t.j. koeficient množenia = 5).
4. Pri multiplikačnej fáze výroby sadeníc v podmienkach in vitro získame vo väčšine prípadov iba olistené výhonky bez koreňov. Preto treba dopestované rastliny premiestniť na vhodné zakoreňovacie živné médium, na ktorom namnožené sadenice zakorenia.
5. Potom nasleduje prevod zakorenených sadeníc do nesterilného substrátu v podmienkach in vivo. Vlastný proces prevodu je sťažený skutočnosťou, že prevádzané rastliny sú veľmi zraniteľné, pretože pri raste v optimálnej mikroklimatickej sterilných podmienok sú krycie pletivá sadeníc veľmi redukované (napr. nie je vyvinutá kutikula). To spôsobuje, že veľmi vysychajú a často sú napádané rôznymi najmä hubovými ochoreniami. Preto je dôležitá optimalizácia postupu pestovania a výživy s hlavným dôrazom na dotvorenie dokonalého koreňového systému sadeníc.

2.2.2 Zloženie živných médií

Základným predpokladom pre úspešné založenie a ďalšiu kultiváciu rastlinných explantátov je použitie vhodného kultivačného média. Požiadavky izolovaného pletiva na zloženie živného média sú tým väčšie, čím menšiu a menej organizovanú časť rastlinného tela explantát predstavuje.

Neexistuje, zatiaľ univerzálne živné médium, na ktorom by bolo možné s úspechom kultivovať akékoľvek rastlinné explantáty. Základy dnes používaných živných médií položili HELLER (1953) a WHITE (1954). Živné médium WHITEa rozpracovali MURASHIGE a SKOOG (1962). Na základe týchto troch živných médií bolo odvodené veľké množstvo rôznych modifikácií, ktoré sa odlišujú predovšetkým obsahom organických látok a rastových regulátorov.

Medzi zložky živných médií patria: anorganické látky (voda, mikroprvky a makroprvky), organické látky (vitamíny, regulátory rastu, zdroje uhlíku a dusíku), látky tvoriace matrix média, aktívne uhlie a osmotické látky.

Anorganické látky

Voda – zaujíma viac než 95% celkového objemu všetkých živných médií.

Makroprvky – O, N, H, C, K, Na, Ca, Mg, P, S – sú podávané vo forme solí. Hladina dusíku a fosforu je dôležitá z hľadiska syntézy sekundárnych metabolitov. Rýchlo rastúce pletivá majú zvýšenú spotrebu fosforu a draslíka. Všeobecne platí, že predávkovanie optimálneho množstva látok neškodí.

Mikroprvky – Cu, Mn, Zn, B, Fe, Mo, Cl, I – sú potrebné pre výživu a rast všetkých buniek vyšších rastlín, pričom sú postačujúce v malých koncentráciách. Železo pridávame vo forme anorganických solí býva zvyčajne pre kultúry neprístupné. Východiskom je používanie Fe vo forme citrátu alebo v komplexe EDTA.

Organické látky

Organické zdroje uhlíku – najčastejšie používané sú cukry, najmä sacharóza. Ich význam spočíva v tom, že väčšina pletív pestovaných v kultúrach in vitro prechádza úplne na heterotrofnú výživu (väčšina pletív stráca čiastočne alebo úplne schopnosť tvoriť chloroplasty, ktoré by boli schopné fotosyntézy). Z tohto dôvodu potrebujú organicky viazaný uhlík, ktorý metabolizujú, a tým súčasne získavajú aj energiu.

Organické zdroje dusíku – kvasnicový extrakt, kokosové mlieko, kazeínhydrozolat alebo paradajková šťava. Sú dôležité z toho hľadiska, že anorganický zdroj dusíku (nitrátový alebo amónny) je často nedostačujúci pre intenzívny rast pletivovej kultúry. Proti používaniu týchto zmesí sú značné výhody, lebo po chemickej stránke sú to zmesi, ktoré sa nedajú presne definovať. Pridávanie jednotlivých aminokyselín do živných médií nie je nevyhnutné, môže však stimulovať proliferáciu.

Vitamíny – najviac používané sú thiamín (B₁), riboflavín (B₂), pyridoxín (B₆), kyselina nikotínová, kyselina paraaminobenzoová, kyselina askorbová, biotín, kyselina cholová, kyanokobalamín, vitamín E a m-inozitol. Slúžia ako kofaktory enzýmov a používajú sa v stopových množstvách. Vitamín B₁ je dôležitý pre rast. Nízky množstvá vitamínu B₂ stimulujú rast na svetle, v tme sú bez účinku, vysoké na svetle rast brzdia a v tme pôsobia stimulačne. Vitamín B₆ je prekurzorom pyridoxalfosfátu, ktorý má dôležitú úlohu v látkovej výmene bunky. M-inozitol sa považuje za nutričnú látku a môže slúžiť ako prekurzor polyurónových kyselín, ktoré sa zúčastňujú na stavbe bunkovej steny. (Yadav, Tyagi, 2006)

Regulátory rastu (rastové látky) – majú základné postavenie v regulácií životných procesov rastlín. Sú schopné urýchľovať, spomaľovať alebo inak modifikovať metabolické procesy, ktorých výsledkom sú zmeny v raste, vývine a morfogénéze rastlín. Nepatria ani k stavebným ani výživným látkam, nie sú teda stavebným materiálom alebo zdrojom energie pre rastlinné bunky. (Komplexne popísané boli v predošlej podkapitole 1.8.1)

2.2.3 Kultivačné podmienky

Pri pestovaní rastlinných explantátov je okrem zloženia živného média dôležité zabezpečiť vhodné kultivačné podmienky (teplota, svetlo, aerácia, pH, osmotický efekt).

Teplota kultivácie – môže ovplyvňovať metabolické reakcie tým, že regulačne zasahuje do ich priebehu. Izolované rastlinné explantáty majú vyššie požiadavky na stálosť teploty ako intaktná rastlina. Pre rast vyžadujú vyššiu teplotu ako materská rastlina. Teplota kultivácie sa pohybuje v rozmedzí 20-30 °C.

Svetlo – keďže trvalý výskyt chlorofylu v izolovaných rastlinných explantátoch je výnimočný, možno fotosyntetický účinok osvetlenia u väčšiny kultúr zanedbať.

Aerácia – prevzdušňovanie kultúr – pri kultivácií na pevných živných pôdach, resp. na tekutých s použitím papierového nosiča, v bankách uzatvorených vatovou zátkou je výmena plynov pre rast buniek kultúry dostatočná. Pri kultivácií bunkových suspenzií je dostatočné prevzdušňovanie nevyhnutnou podmienkou ich rastu a môžeme ho zabezpečiť miešaním, trepaním, vháňaním sterilného vzduchu alebo kombináciou uvedených postupov.

pH prostredia – väčšina kultúr rastlinných buniek je pomerne odolná voči kolísaniu pH živnej pôdy a je schopná rásť v širšom rozmedzí pH ako kultúry živočíšnych buniek. Kultivácia rastlinných buniek je možná v prostredí s pH rozmedzím 4-7,5. Mimo tieto hranice sa zastavuje ich rast a vývoj in vitro.

Osmotický efekt – pod týmto pojmom chápeme prírastok hmotnosti čerstvej biomasy a sušiny, za súčasnej redukcie bunkových rozmerov, spôsobený zvýšením koncentrácie sacharidov (glukózy, sacharózy, sorbitolu, manitolu) v živnom médiu.

2.3 Význam pletivových kultúr v šľachtení rastlín

Ako sme už vyššie priblížili a spomenuli výhody pri meristémovom množení, jeho častého využitia, je vhodné priblížiť aj všeobecný význam množenia pomocou pletivových kultúr. Je jasné, že dnes sa pozerá hlavne na efekt a rýchli zárobok, nie až tak na kvalitu a vlastnosti rastlín, ktoré sú vypestované, to je až na druhom mieste, ale pletivové kultúry majú širokú škálu významu.

Význam:

- Mikrorozmnožovaním môžeme produkovať veľké množstvo identických rastlín – klony (lesníctvo a kvetinárstvo).
- Jednoducho získavať rastliny zo semien, ktoré majú v prirodzených podmienkach nízku klíčivosť.
- Ozdravovať rastliny od vírusov.
- Prekonávať nekrížiteľnosť vzdialených taxónov rastlín.
- Dlhodobo udržiavať rastlinný materiál – genetické zdroje in vitro.
- Získavať a udržiavať rastliny s peľovou sterilitou.
- Získavať homozygotné línie rastlín z haploidov vytvorených in vitro.
- Regenerovať celistvé rastliny z bunky, ktorej genóm bol biotechnologicky upravený.
- Výhodnejšie testovanie buniek (v porovnaní z celými rastlinami napríklad na odolnosť voči herbicídum – selekcia in vitro).
- Veľkokapacitná kultivácia buniek v tekutom médiu v bioreaktoroch pre tvorbu sekundárnych metabolitov (biofarmaceutiká). (prof.RNDr. Milan Bežo,CSc.)

3 Regenerácia drevín v podmienkach in vitro

Metóda in vitro je všeobecne využívaná pre obrovské množstvo rastlín. U trvaliek a okrasných kvetov je jej prínos priam nespočítateľný, pretože väčšina kvetov má mäkké pletivá, nedrevnatie a veľmi ľahko zakoreňuje a tvorí kalus. Dlho sa trápili s rozmnožovaním v podmienkach in vitro u drevín. V tomto prípade bolo veľmi náročné stanoviť vhodné kultivačné média, podmienky a zistiť vôbec, z ktorých častí je schopná drevena regenerovať. Preto sme aj v prvej kapitole priblížili, prečo existuje mechanizmus regenerácie. Čo sa vlastne stalo základom pre množenie in vitro, teda regenerácia je stavebným kameňom celého množenia v podmienkach in vitro. Druhým nastávajúcim problémom bolo do akej miery sa bunky dokážu dediferencovať, práve u drevín to bola ťažká otázka. Už zhrubnutá časť dreveniny, je tým náročnejšia, čím je staršie pletivo. Začala sa preto odstraňovať táto zdrevnatená časť a bunky ktoré sú pod ňou ešte mladé sú schopné dediferenciácie. Vytvoril sa systém odberov častí z drevín, teda mäkkých častí, ako sú, vrcholové výhonky, listové odrezky, púčikové atď.

No postupom času, ako sa rozširovalo pôsobenie metódy in vitro u stále väčšieho množstva drevín, bolo stále viac vidieť rozdieli medzi jednotlivými typmi drevín a ich potrebami. V základe sa technologické postupy u drevín a bežných okrasných trvaliek nelíšia. Najväčšia rozdielnosť prichádza v kultivačných médiách. A to nie len pri drevinách a trvalkách ale veľká diferenciacia je medzi samotnými drevinami. Dokonca nie len medzi ihličnatými a listnatými ale aj jednotlivito medzi stromami všeobecne.

3.1 Modely regenerácie in vitro u vybraných drevín

V tomto modelovom príklade sa ukáže ako veľmi je náročné vybrať pre určitú drevinu spôsob jej rozmnožovania v in vitro podmienkach. Následne vybrané tri okrasné dreveniny poslúžia na dokumentáciu rozdielnosti ich spôsobu regenerácie v podmienkach in vitro. Najzákladnejších je päť kategórií, ktoré sú súčasťou každej regenerácie v podmienkach in vitro, aj keď samozrejme okrem nich sú aj ďalšie, ale tie majú menší vplyv na samotnú regeneráciu. V príklade sa jasne ukazuje kde sa tvoria bežne pri množení najväčšie odchýlky, a kde je regenerácia u drevín totožná.

Základné kategórie sú:

- Technologický postup
- Fyzikálne podmienky

- Časovanie odberov
- Nadstavenie kultivačného média
- Špecifické úpravy kultivačných médií

3.2 Pagaštan konský – *Aesculus hippocastanum*

Pagaštan konský pochádza z južnej Európy, presnejšie z Balkánu, a u nás zdomácnel tak, že sa vysádza všade v mestách i na dedinách, do stromoradií, sadoch, lesoch a pri ľudských príbytkoch ako okrasný solitér aj ako tieňová drevina hospodárskych dvorov. Je veľmi využívaný na lekárske účely. Lisry a kvety obsahujú cukor, sliz, trieslovinu a iné. Vo farmácii ich využívajú na prípravu odvarov, čajov a extraktov (Allen J. Combes, 2001).

3.2.1 Regenerácia Pagaštana konského v in vitro podmienkach

Už dlho sa skúmalo či je možné u *P. konského* regenerovať z dormantných púčikov. Kamenická a Rypák (1984), zistili, že po umiestnení vrcholového púčika na vhodné médium sa vytvárajú na jeho báze početné adventívne púčiky. Po 4-5 týždňoch od založenia púčika na kultivačné médium, sa začína jeho predlžovací rast. Po ďalšom pasážovaní na médiu sa dopestovala rastlina s dobre vytvorenou nadzemnou časťou a s koreňovou sústavou. Dopestované rastliny sa presadilo do zmesi piesku a rašeliny, kde pokračovali v raste. Ak sa pestovali púčiky, z ktorých sa odstránilo púčikové lôžko, nastala proliferácia kalusu (Kamenická, Rypák, 1989).

Technologický postup je v zásade bežný, ako pri kalusových kultúrach (popísaný v podkapitole 2.2.1).

Fyzikálne podmienky pre pagaštany je nutná svetelnosť 16/8 hodinová fotoperiódou (svetlo/tma), teplota 25±2 °C v tmavej komore, kde pH sa udržiava v médiu okolo 5,7.

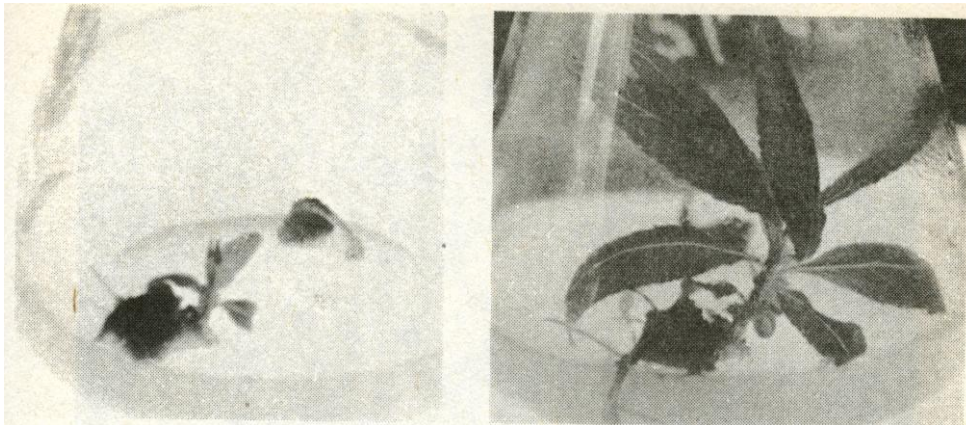
Dôležitým faktorom ovplyvňujúcim kalogenézu je čas odberu, kde najúčinnším časom pre *P. konský* je podľa predpokladov február. Zima nie je vhodná. Februárové odberové vzorky obsahujú dostatok natívnych hormónov.

Nadstavenie média je veľmi citlivé. Kamenická a kol. (1987) zistili, že exponenciálna fáza rastu kalusovej kultúry pagaštana konského je náročná na spotrebu kationov (Fe,

Zn, Ca, Mg, Na, K). Používa sa pre základ tekuté médium MS s obsahom 30 μM BA, 2% sacharózy. Po 4-5 týždňoch sa presúva na nové médium s obsahom IBA.

Špecifické úpravy podľa Kamenická a Rypák (1987), „pagaštan konský je závislý na doplnení 150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ meso – inositolu na rast kalusovej kultúry.“ (Kamenická, Rypák, 1989)

(Obr.3, Kultivácia *P. konského*.) V ľavo rast výhonku z vrcholového púčika *P.konského*. V pravo zakorenený výhonok.



3.3 Cyprušteľ tupolistý – *Chamaecyparis obtusa*

Je to hojne rozšírený strom hlavne v japonských horách na suťových svahoch, kde bežne dorastá do 60 m. U nás v európskych podmienkach je to malý iba 10-12 m vysoký strom. Jeho využitie v dnešnej dobe je hlavne ako okrasná drevina, preferované sú zakrpatené kultivary. Ako príslušník rodu coniferaceae je veľkovýrobne často propagovaný druh, priamo v in vitro kultúrach. (Vreštiak, 2001)

Podarilo sa už dosiahnuť úspech z mnohými zástupcami z rodu konifer aj z ekonomického hľadiska. Práve *Chamaecyparis obtusa* (*Ch. obtusa*) patrí k jedným z nich. (Ishii 1986). Mnohé štúdiá dokázali, že propagáciou z koreňových prímordií, juvenilných sadeníc, adventívnych výhonkov, z listov (Ishii 1986, Ishii et al 2003, Ishii a Sato 1989), mikroodrezkami (Ide a Yamamoto 1996) dochádza k somatickej embryogenéze a regenerácií (Taniguchi et al.2004, Amano a Sakatani 1987) pri duhu *Ch. obtusa*. Stanovenie presného zloženia kultivačného média pre *Ch. obtusa*, bolo

predmetom dlhých vedeckých pokusov a štúdií. (Propagation of ornamental plants, Vol.10, 2010)

3.3.1 Regenerácia *Chamaecyparis obtusa* v in vitro podmienkach

Technologický postup je podobný ako v predošlom prípade, s tým, že sa bežne preferujú orgánové kultúry.

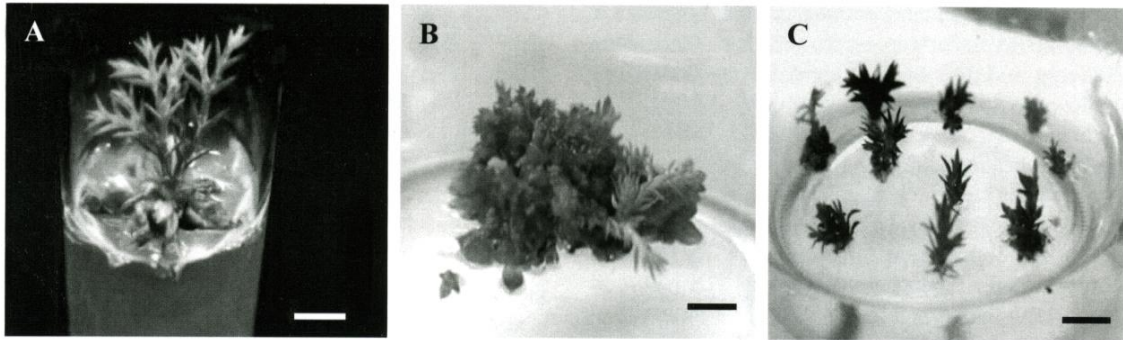
Fyzikálne podmienky pre *Ch. obtusa*, využívajú svetelnú fotoperiódou 15/9 hodín (svetlo/tma) za teploty 25± 2 °C a rastovej komore s fluorescentným svetlom okolo 25 μmol m⁻² s⁻¹.

Časovanie sa určuje v závislosti od kultivaru. V tomto prípade to bol koniec Augusta.

Médium sa v základe využíva MS (Murashige a Skoog 1962). Normálne pre bunkové kultúry, príp. orgány, je nevyhnutné aby bol dodaný zdroj uhlíka do média. Sacharóza je považovaná za najlepšiu náhradu karbohydrátov, hoci glukóza je všeobecne považovaná tiež za veľmi vhodnú. (George a Sherrington 1984). *Ch. obtusa* je vhodný druh stromu pre regeneráciu v podmienkach in vitro. Zistil sa fakt, že práve koncentrácia exogenného cytokinínu je hlavným faktorom ktorý ovplyvňuje multiplikáciu rastových častí. Práve koncentrácia BAP u *Ch. obtusa* ovplyvňuje rastovú fázu a predložovanie koreňov. V tekutom médiu NN, LS s vyššou dávkou cytokinínu BAP (2.2. – 4.4 μM) sa najlepšie regeneruje *Ch. obtusa*. (Ishii 2002). Dokonca aj na médiu WP s vyššou dávkou BAP sa veľmi dobre darí pri multiplikácií, zistil Maruyama (2003).

Ďalšie úpravy média sú nutné v 7 týždni dodanie 1% fruktózy, 1.44 μM giberilínovej kyseliny (GA₃). Kôli predĺžovaciemu rastu. (Propagation of ornamental plants, Vol.10, 2010)

(obr.4, Kultúry *Ch.obtusa*) A, Idukcia adventívnych výhonkov na médiu MS (4.44 μM BAP). B, Adventívne výhonky na médiu WP (4.44 μM BAP, po 2 mesiacoch). C, Predlžovacia fáza multiplikácie na WP médiu (podporené s 1.44 μM GA₃).



3.4 Lagerstroemia – Lagerstroemia speciosa

Jeden z najvýznamnejších okrasných listnatých stromov *L. speciosa* sa tradične rozmnožuje pomocou semien. Má veľmi krátku dobu klíčivosti (2 mesiace) hneď začiatkom prvých dažďov (Hadiuzzaman et al. 1992). Popri tom propagáciou pomocou semien nedosahujeme dostatočné genetické charakteristiky ako mal materský strom. A takisto vegetatívne spôsoby rozmnožovania ako je vrúbľovanie neboli dostačujúce. Pôvodné druhy neboli veľmi silné ale postupným šľachtením sa vyvinul vo veľmi zaujímavý okrasný strom. (Propagation of ornamental plants, vol.10, 2010)

3.4.1 Regenerácia Lagerstroemia speciosa v podmienkach in vitro

Technologický postup je veľmi podobný ako predošlé, opäť je to kalusový spôsob regenerácie. Odoberá sa vzorka, tá je dezinfikovaná a uložená do média.

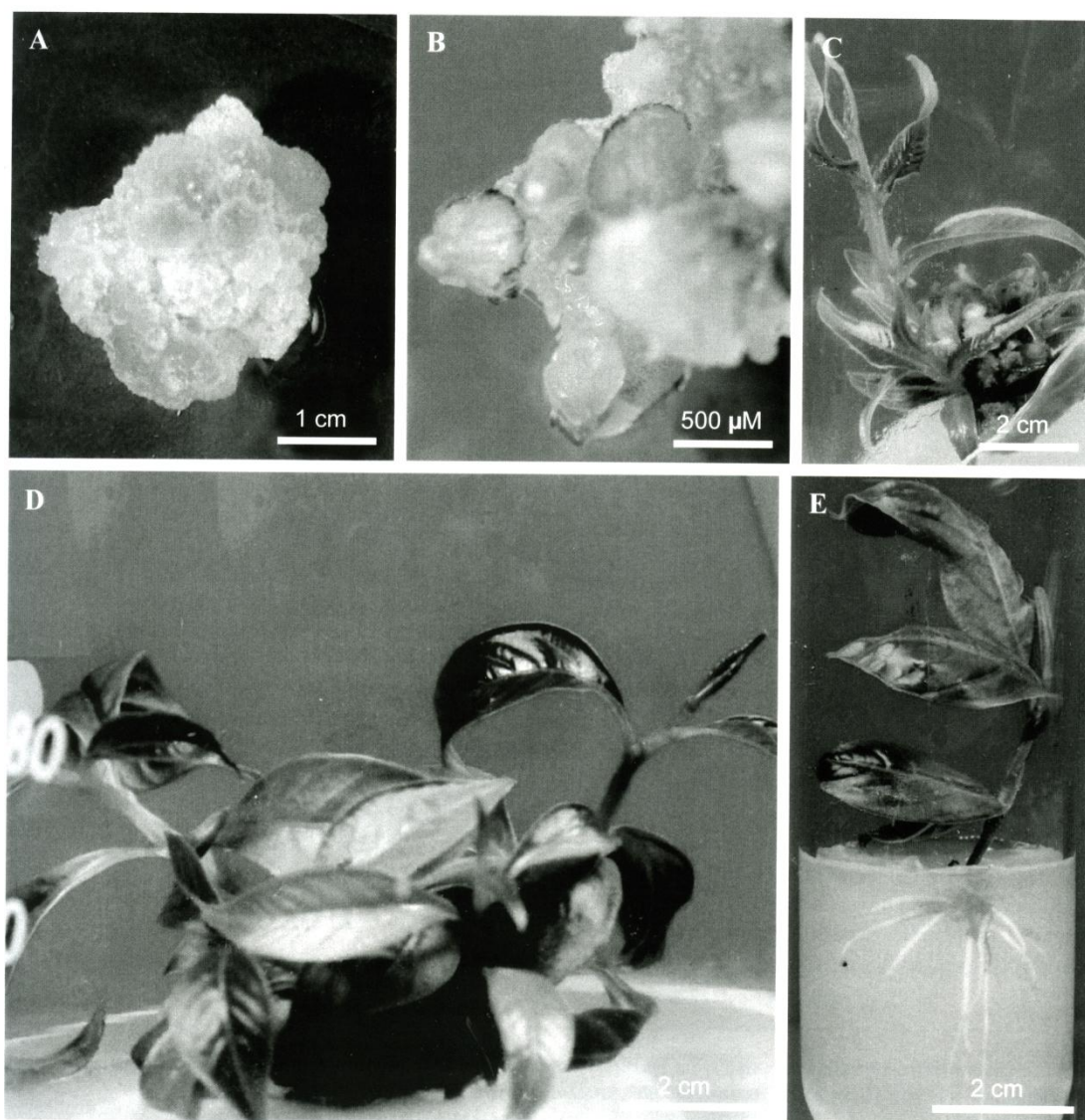
Fyzikálne podmienky sú upravené pre tento typ stromu, teploty 26 +/- 1 °C pod 16 hodinovou fotoperiodou. Pod chladným bielym svetlom fluorescentným (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), s relatívnou vlhkosťou 60%.

Časovanie sa programuje na Február, odoberajú sa jarné výhonky z 10 ročných materských stromov.

Médium sa bežne využíva MS (MMS, polovičná sila makroelementov, plná sila mikroelementov a vitamíny s MS média). Doplnené o rastové regulátory pre indukciu kalusu, regeneráciu výhonkov a koreňovú reguláciu. Dodalo sa aj 568 μM AA. Na MMS médiu sa využíva buď 2.0, 4.0, a 8.0 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic kyseliny (2,4-D) alebo v kombinácii s 1.0 μM BAP pre indukciu kalusu. Najlepšie sa vyvíja kalus na MMS + 4.0 μM 2,4-D + 1.0 μM BAP + 568 μM AA prípadne sa nahrádza koncentrácia BAP. Využíva sa tiež 10 % (v/v) kokosová voda (CW) ako vysoký zdroj organických látok.

Ďalšie úpravy média sa nerobia iba tie ktoré sme vyššie popísali. Médium mení a dopĺňa každé 4 týždne ako pri každej regenerácii v in vitro podmienkach. (Propagation of ornamental plants, vol.10, 2010)

(Obr.5, Kultúra *L.speciosa*) A, Indukcia kalusu s listových segmentov na MS médiu + 4,0 μM 2,4-D + 1,0 μM BAP + 100 mg $\cdot\text{l}^{-1}$ AA po 6 týždňoch kultivácie B, C, D, Regenerácia výhonkov s kúsku kalusa z listového segmentu vloženého do MMS + 5,0 μM BAP + 3,0 μM NAA +10% CW + 568 μM AA B, indukovaný púčik po 4 týždňoch C, predĺžené výhonky po 8 týždňoch D, zhluk predĺžených výhonov po 12 týždňoch po prenose E, zakorenený výhonok po prenose na MMS + 1,0 μM IBA + 568 μM AA.



Tabuľkové zhrnutie

	Aesculus hippocastanum	Chamaecyparis obtusa	Lagerstroemia speciosa	Zhodnosť regenerácií:
Technologický postup	Zhodný	Zhodný	Zhodný	<i>Zhodný postup</i>
Fyzikálne podmienky	16/8 fotoper. 26°C teplota 5,7 pH (ostatné nešpecifikované)	15/9 fotoper. 25 °C teplota 5,7 pH 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (chladné fluorescentné svetlo) Vlhkosť nešpecifikovaná	16/8 fotoper. 26 °C teplota 5,7 pH 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (chladné fluorescentné svetlo) 60% vlhkosť	<i>Aesculus a Lagerstromia sú podobé. U Chamaecyparis ako pri coniferaceae je veľká rozdielnosť.</i>
Časovanie odberu	Február	Koniec Augusta	Február	<i>Rod konifer sa líši.</i>
Kultivačné médium	MS + 30 μM BA + 2% sacharózy (+ o 2 týždne IBA)	MS, NN, LS, WP. NN/LS+BAP(2,2 -4,4 μM)	MS/MMS+568 μM AA alebo pre kalusovú indukciu:MMS + 4.0 μM 2,4-D + 1.0 μM BAP + 568 μM AA	<i>Rozdielnosť médií je veľmi veľká. Pri každom druhu iné koncentrácie a aj samotné typy medií.</i>
Úpravy média	150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ meso – inositolu	1% fruktózy, 1.44 μM giberilínovej kyseliny (GA_3)	Zatiaľ nie presne určené	<i>Rozdielnosť.</i>

3.5 Rozdielnosť a jej význam

Z poznatkov, vedeckých štúdií je viditeľné kde vznikajú odlišnosti medzi jednotlivými modelovými drevinami. Práve podľa tabuľky je zrejmé, že v technologickom postupe sú najmenšie rozdiely. U každého typu dreveniny prevažuje spoločná technológia regenerácie v podmienkach in vitro, teda presnejšie proces odberu, dezinfekcie vzoriek, následne uloženie na médium atď. Na rozdiel od fyzikálnych podmienok kde sú rozdiely, pretože každá vzorka reaguje rôzne na teplotu, vlhkosť a svetlo. Na príklade Lagerstroemie, ktorá vyžaduje $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (chladné fluorescentné svetlo) oproti Chamaecyparisu, ktorý potrebuje len $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (chladné fluorescentné svetlo), čo je vlastne dvojnásobok potrebný pre Lagerstroemiu spiciosu. Ostatné fyzikálne podmienky pre dreveniny nie sú tak výrazne ako svetelné podmienky. Z týchto štúdií môžeme zdefinovať, že väčšina drevín sa regeneruje rovnakým technologickým postupom, s vysokou pravdepodobnosťou podobných fyzikálnych podmienok.

Časovanie odberov ako faktor je už o niečo výraznejší, napríklad kôli koncentrácii hormónov v pletive. Potrebná informácia je ako reagujú odrezky z drevín na koncentráciu auxínu IBA. Pri vegetatívnom rozmnožovaní odrezky potrebujú syntetický auxín IBA a obsahujú u niektorých druhoch aj natívny auxín (Schneider et al. 1985, Müller et al. 1995) ktorý sa používa na zvýšenie rastu. Externé podmienky (napr. teplota, pôda, ovplyvňujú IBA) môžu ovplyvniť zakoreňovaciu schopnosť odrezkov (Rathore 1983). Nie je presný názor na optimálnu koncentráciu IBA (Tofanelli et al. 2001). Dôležitý je čas kedy sú odrezky odoberané. Rozdielnosť v koncentrácii IBA je veľmi silná. Zakoreňovacia schopnosť je najsilnejšia všeobecne u väčšiny druhov na konci jesene. Počas tejto periódy nie sú veľké zmeny pri dávkach IBA do média, až na niektoré typy, kde je IBA esenciálna pre chytenie explantátu. Decembrové a Januárové odrezky sú často už omnoho citlivejšie na vysoké dávky IBA, rýchlo odumrú. (Propagation of ornamental plants, vol. 10, 2010). Z tohto vyplýva, že ročné obdobie je výrazným faktorom. Môžeme odvodiť podobnosť pri druhoch Lagerstroemia a Aesculus ako listnatých drevín, Február ako veľmi vhodné obdobie. A pritom stále mnoho iných druhov, a hlavne ihličnanov preferujú iné ročné obdobia.

Správne určenie kultivačného média je najnáročnejšou časťou regenerácie v podmienkach in vitro. Na príklade je ukázkovo vidieť rozdielnosť, ktorú daní autori v pokusoch uviedli. Každý kultivar, každý strom potrebuje o niečo iné médium. Dokonca aj podobné druhy sa môžu líšiť koncentraciami. Základom pre tieto modelové príklady bolo MS médium ale pri druhu Ch. obtusa sa publikovali aj iné (NN, LS, WP) a pri L. speciose mohlo byť aj MMS. Najnáročnejšie na úpravu by mala byť L. speciosa, ktorá obsahovala konkrétne o 4 látky navyše, oproti základnému médiu pre Aesculus hippocastanum. Média sú preto považované všeobecne za najšpecifickejšie pri regenerácii rastlín v podmienkach in vitro. A často zlyháva celý rast aj na len drobnej koncentrácii, ktorá nebola správna. A preto sú predmetom širokých štúdií v mnohých krajinách a množstvo vedcov hľadajú kombinácie koncentrácií pre špecifické druhy.

Pri úprave média ako poslednej dôležitej kategórií sa rozdiely mnohonásobne prehĺbili a nenašla sa zhoda to už ani pri jednom druhu, ktorý sme si vzali ako príkladný model. Každá drevina, či listnatá alebo ihličnatá je špecifická a toto štádium je väčšinou už len o skúšaní, ktoré najviac bude vyhovovať.

3.5.1 Východiská pre určenie podmienok regenerácie drevín v podmienkach in vitro

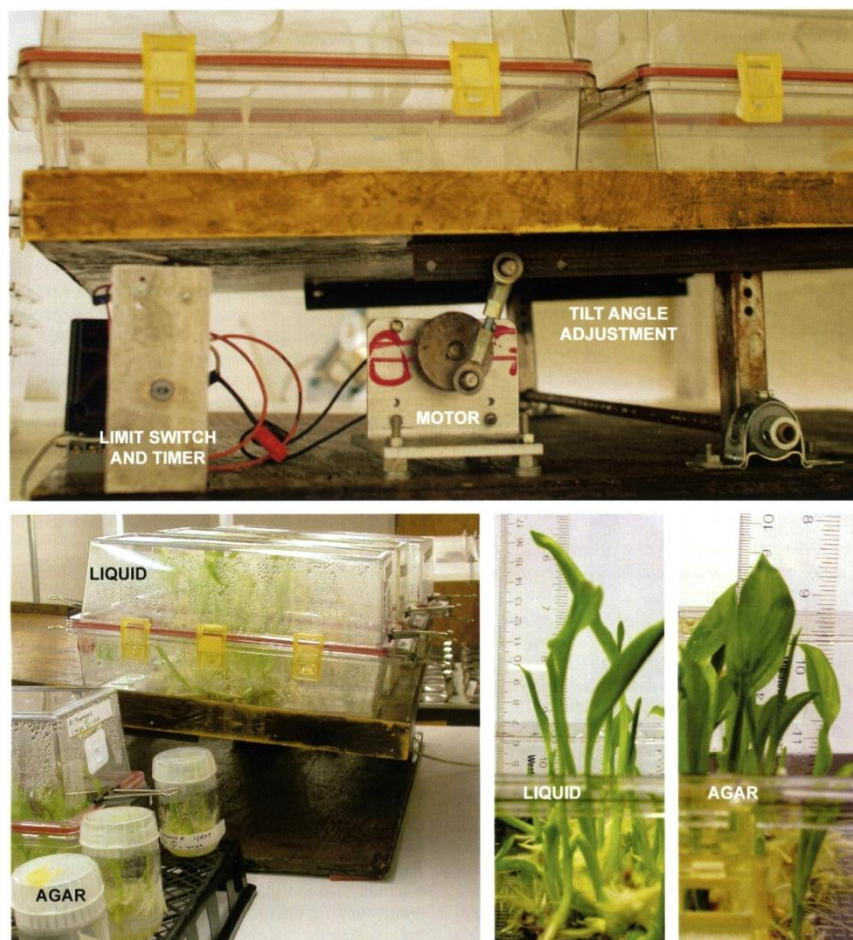
Všeobecne podľa príkladných modelov realizovaných regenerácií v podmienkach in vitro môžeme povedať, že percentuálne pri regenerácií akéhokoľvek druhu dreviny, ktorý sa prevedie, bude technologický postup sedieť takmer na 100%, z malými výnimkami. Fyzikálne podmienky aj keď je mnoho odchýliek sa dajú považovať tiež za všeobecne podobné. Pri časovaní je nutné odhadnúť koncentráciu hormónov v rastline, a je veľká pravdepodobnosť, že neskorá zima, presnejšie Február bude vhodný. U kultivačného média sa v štúdií musí skúšať jeho vhodnosť, aj keď médium MS sa môže považovať za východzie s vysokou pravdepodobnosťou úspešnosti. A konečné ladenie média a regulovanie rastu pre správny vývin explantátu je už najmenej pravdepodobné, že sa podarí na prvý raz a je nutné rátať dopredu s komplikáciami a experimentovaním.

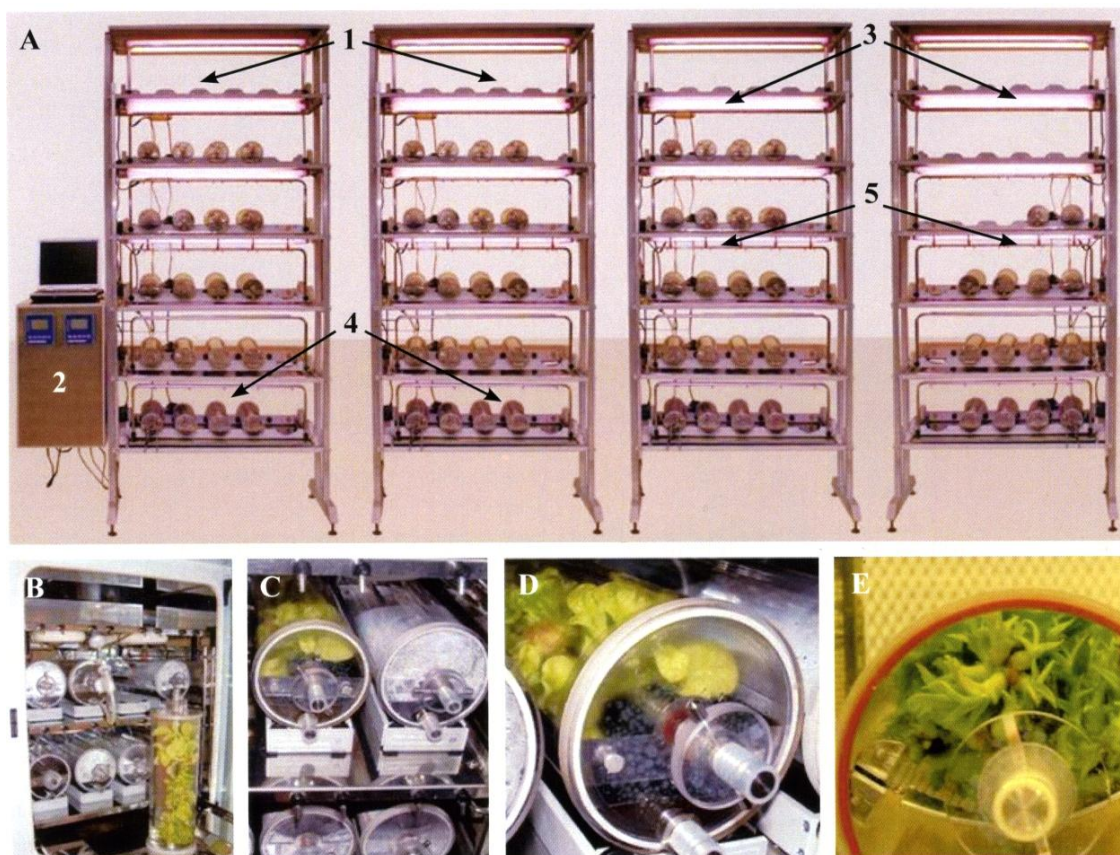
3.6 Kultivačné nádoby, problematika s vitrifikáciou

Dôležitú úlohu zohráva aj kultivačná nádoba. Je to špecializovaná nádoba pre mikropropagáciu, ktorá vie udržiavať presné podmienky. Dostatok vody počas cyklu kedy sa tvorí postupne kalus a ďalšie fázy, monitorovať celý proces a i. Sú špeciálne navrhnuté tak, aby dovoľovali efektívny manažment rastlinných prepojení s tekutým médiom a plynmi ako kyslík, aby boli ľahko dostupné pre rastliny. Rastlinné kultivačné nádoby sa kategorizujú na plne a čiastočne ponorené typy, odvodzujúc sa od typu kultúry a média. Hlavným pravidlom je, že plne ponorené typy sú lepšie pre bunkové kultúry, embryonálne a vláskové korenné odrezky. Čiastočne ponorené sú vhodné pri somatickej embryogenéze vo fáze premeny na klíčnu rastlinu, mikropropagácií. Pre rastlinnú propagáciu je čiastočná kultivačná nádoba účelnejšia. Typ kultivačného média môže byť plne na agare, statické tekuté médium alebo rozrušené tekuté médium. Gélové typy, ako agar sú jediné média z ktorých rastlina nenasáva žiadnu zložku. Bohužiaľ, problémom je nedostatok prístupnej vody pre rastlinu. Najprv čerstvý explantát, ktorý je vložený do bioreaktoru na agarové živné médium sa nachádza v miernej vrstve jemnej vody ktorá ho plnohodnotne vyživuje. Avšak počase keď sa nachádza “ príliš ” dlho v agare začne sa vysušovať, agar postupne zlieza a neobopína explantát tak ako má. Nastáva šok (Adelberg). Preto tekuté média majú lepšiu schopnosť dodávať dlhodobu vodu (George et al. 2008). Rozrušené tekuté médium má veľmi dobré výsledky podobne ako aj statické tekuté.

Zaujímavý poznatok nastal pri sledovaní vplyvu veľkosti nádob na rast kultúr. Pri nádobach väčšieho typu na tekutých médiach je nárast rastliny po určitej dobe takmer o tretinu väčší ako na rovnakom médiu v menšej nádobe. Nárast rastlín na médiu z agaru, bolo rovnaké pri oboch typoch nádob. Preto je nutné myslieť aj na veľkosť nádoby a typu kultivačnej nádoby.

(Obr.6, Kultivačné nádoby) Starší prototyp kultivačnej nádoby, v ktorej sa zvykol porovnávať rast na agare a na tekutom médiu (*Curcuma longa* L.). Rastliny na agare sú o polovicu menšie ako tie v tekutom médiu vo väčšej nádobe.





(Obr.7, Systém kultivačných nádob) A, Pilotná stena kultivačných nádob inštalovaná v Department of Plant Biotechnology, University of Debrecen (Debrecen, Hungary) v 2006/2007. Základné prvky sú: 1, počítačovo kontrolovaná elektronická rotačná hlavica, 2, elektrotechnická programovacia jednotka, 3, počítačovo kontrolovaná svetelnosť, 4, aseptické moduly kontroly, 5, počítačovo kontrolovaný prísun vzduchu a ventilácia. B-D, reverzibilne otáčajúce aseptické kultúry tabaku, E, explantáty ananásu kultivované v špeciálnom module.

Problematický jav vitifikácia

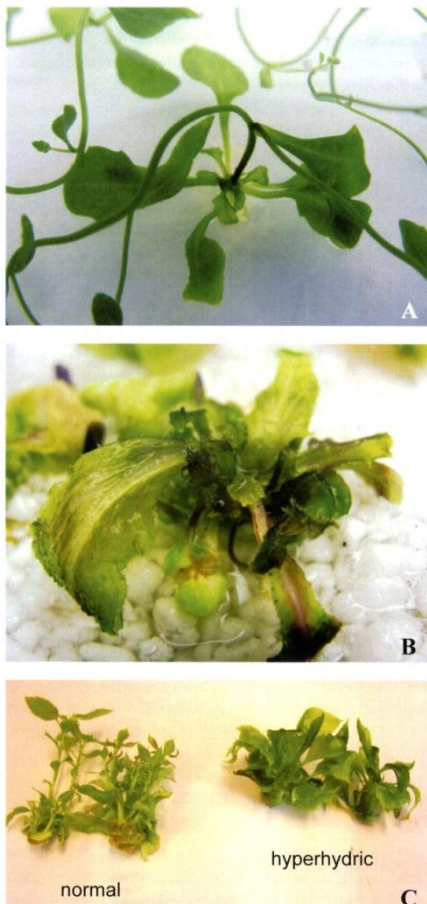
Vitrifikácia (syn. hyperhydricita)

Práve tento jav spôsobuje mnohé škody v komerčnom množení (Pâques 1991). Stáva sa to u mnohých druhov rastlín (byliny, dreviny, kaktusy, sukulenty), vyvíja sa to hlavne pri listoch a zapríčiňuje slabý rast až odumretie pri prenose do ex vitro podmienok (Dillen a Buysens 1989). Môže byť veľmi silná, a ovplyvniť vrchol, ktorý následne prestane rásť. Je mnoho publikácií ktoré popisujú anatomické znaky rastlín trpiacich hyperhydricitou. (Ziv 2008). Najzákladnejším znakom je sklenený povlak,

alebo aj zjav rastliny je sklovitý. Mnoho autorov poznamenáva aj zvráskavené listy, zvltnené a pokrútené listy. Dôvodom spustenia hyperhydricity je premokrenie, príliš mnoho vody ktorá sa absorbuje do explantátu. Ďalšou možnosťou je kyslíkový stres. Zatiaľ nie je jasné ako by sa dala zastaviť už spustená hyperhydricita, ale skúma sa to ďalej. (Propagation of ornamental plants, vol. 10, 2010)

Pri regenerácií vzniká aj mnoho ďalších komplikácií, vitrifikácia je jednou z najčastejších a najzaujímavejších.

(Obr.8, Vitrifikácia - Hyperhydricita) A, Normálne výhonky *Arabidopsis thaliana*, B, Hyperhydrické výhonky *A. thaliana*, C, Normálne a hyperhydrické výhonky *Malusu* 'Jork 9'



Záver

Metódy rozmnožovania pomocou explantátových kultúr dosahujú v porovnaní s tradičnými metódami (semená, odrezky a pod.) mnohé výhody, najmä čo sa týka rýchlosti koeficientu rozmnožovania, získania bezvírozného materiálu, možnosti dlhodobého uchovávanía (genobanky), množenia ťažko zakoreňujúcich jedincov a rozšírenia možností hybridizácie a šľachtenia. Rýchlejšiemu prenikaniu týchto metód do praxe v súčasnosti ešte zabraňujú pomerne vysoké náklady, nízky rozmnožovací koeficient niektorých druhov drevín a špecifické nároky na pestovanie a adaptáciu regenerantov v prírodných podmienkach.

Dreviny regenerované v podmienkach in vitro sú najnáročnejším predmetom, oproti bežným okrasným nižším rastlinám. Cieľ práce, definovať východiská regenerácie drevín v podmienkach in vitro sme splnili, pretože sa nám podarilo priblížiť dôležité potrebné podklady, ako fyziologické procesy, spôsoby techník a na modelových štúdiách preukázať východiská. Tieto podmienky alebo inak východiská pre výber metódy v podmienkach in vitro sme rozobrali a popísali ich prečo sú potrebné a od čoho závisia. Vďaka týmto poznatkom má táto práca veľký význam a krásne poukazuje aj pre laikov na všetky potrebné fakty. Ako kompilačná práca, vďaka čerpaniu z mnohých zdrojov sa ukázalo, že v mnohých prácach sú veľmi podobné názory.

V závere sa dá skonštatovať, že v súčasnosti je táto metóda už celkom využívaná aj pre produkciu sadbových materiálov a stále sa zvyšuje jej pole pôsobenia. Aj keď ešte stále ostávajú mnohé nezodpovedané a je ešte čo objavovať, metóda in vitro má veľkú budúcnosť.

Zoznam použitej literatúry

1. BEŽO, Milan, Prednáška z rastlinných biotechnológií, Slovenská poľnohospodárska univerzita v NR, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, [online], Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, B.m: B.v, Dostupné na : <http://bezo.weby.uniag.sk/rbi/rbi03_bunka_totip.pdf>
2. BHOJWANI, Sant Saran – RAZDAN, M.K., 1996, Plant tissue culture: theory and practice, [online], The Netherland, Dostupné na <http://www.google.com/books?id=VwSR77kh94C&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> 1-12s, ISBN 0-444-81623-2
3. COMBES, Allen J. 2001, Stromy. 2 vyd. Bratislava, 179s ISBN 80-8063-066-6
4. DODDS, John H. – ROBERTS, Lorin W. 1985, Experiments in plant tissue culture, [online] 2.vyd. Australia, Dostupné na: <http://www.google.com/books?id=XIXQchGe5wC&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> 70s, ISBN 0-521-30478-4
5. ERDELSKÝ, K.- FRIČ, F. 1979, Praktikum a analytické metódy vo fyziológii rastlín, SPN Bratislava, 575-579s
6. GERGÖ Sándor - PÉTER Bodor - ILDIKÓ Jócsák - ANDREA Brunori-MAGDOLNA Tóth - GYÖRGY Véggyvári, 2010, Hardwood cuttings preparation timing and effect on the IBA uptake and metabolism in Prunus rootstocks, In *Propagation of ornamental plants*, roč.10,2010 č. 2, 75s, ISSN 1311-9109
7. HERRMANN, Rostislav, 2007 Fyziologie rostlin, [online] B.m.: B.v., (ca 2007). 8s Dostupné na <http://www.mentalove.ic.cz/biosa/fyziologie_rostlin_pdf.pdf>
8. HUDÁK, J. – HERICHOVÁ, A. a kol. 1991, Biológia rastlín. B.m.: B.v., (ca 1991). 173-221s
9. JI Yun Min - DONG Jin Park - MI Jin Song - YONG Duck Kim - YOUNG Min Kang - CHANDRAKANT Shivappa karigar - MYUNG Suk Choi, 2010, In vitro propagation of *Chamaecyparis obtusa* sieb. et zucc. In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 3, s.117, ISSN 1311-9109

- MD Mahabubur Rahman - MUHAMMAD Nurul Amin - MD Bablur Rahman - RUBAIYAT Sharmin Sultana, 2010, In vitro adventitious shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf-derived callus of *Lagerstroemia speciosa* (L.)pers., In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 3, s.149, ISSN 1311-9109
10. KAMENICKÁ, Aurélia - RYPÁK, Miloslav. 1989, Explantáty v rozmnožování dřevín. 1 vyd. Bratislava, 51,82,100-104s ISBN 80-224-0132-3
11. LAURA Rojas-Martinez - RICHARD G.F. Visser - GEERT Jan de Klerk, 2010, Hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause, In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 4, s.169, ISSN 1311-9109
- JEFREY Adelberg - MIKLÓS G. Fári, 2010, Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation, In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 4, s.205, ISSN 1311-9109
12. MURASHIGE, T. – SKOOG, F. 1962, *Physiol. Plant*, 15,473-479s
13. PIERIK, R.L.M. 1987, In vitro culture of higher plants, 4.vyd. Dordrecht, TheNetherlands, 5-150s ISBN 0-7923-4527-4
14. PROCHÁDZKA, Stanislav – MACHÁČKOVÁ, Ivana – KREHULE, Jan – ŠEBÁNEK, Jiří. 1998, *Fyziologie rostlin*. 1 vyd. Praha, 240-270,322-334s, ISBN 80-200-0586-2
15. S.ZDRAVKOVIĆ, Korać - Y.MUHOVSKI - P.DRUART - D.ĆALIĆ - L. RADOJEVIĆ, 2004, Agrobacterium rhizogenes-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants, In *Genetic transformation and hybridization* [online], B.m.:B.v (ca2004) Dostupné na:
<<http://resources.metapress.com/pdfpreview.axd?code=h8g7vp1lnwhmrcxu&size=largest>>
16. S.ZDRAVKOVIĆ Korać - D.ĆALIĆ - L. RADOJEVIĆ, 2005, Secondary embryogenesis in androgenic embryo cultures of *Aesculus hippocastanum* L., In *Biologia plantarum* [online], B.m.: B.v. (ca 2005), Dostupné na:
<<http://resources.metapress.com/pdfpreview.axd?code=1537480m7r00p1r0&size=largest>>

17. VREŠŤIAK, Pavol – OSVALD, Zdeněk. 2001, Všetko o ihličnanoch. 2 vyd. Bratislava, 47s ISBN 80-7145-548-2
18. YADAV, P.R. – TYAGI, Rajiv. 2006. Biotechnology of plant tissues, [online] 3.vyd.India,Dostopnéna<http://www.google.com/books?id=2AcbfBHridUC&printsec=frontcover&hl=sk&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> 32-52s , ISBN 81-8356-073-3
19. ZIMA, M. a kol., 1997, Fyziológia rastlín. B.m.: B.v., (ca 1997). 136s
20. ZANE L. Thomas - Hinoky (or False) Cypress – *Chamaecyparis* sp., [online], B.m: B.v., Dostopné na: <<http://www.bonsai-bci.com/species/hinoki.html>>

Obrázky:

Obr.1: Dostupné na <http://bio.kuleuven.be/biofys/Research_e.htm>

Obr.2 Dostupné na <<http://www.plantmethods.com/content/4/1/22/figure/F2>>

Obr.3 KAMENICKÁ, Aurélia - RYPÁK, Miloslav. 1989, Explantáty v rozmnožovaní drevín. 1 vyd. Bratislava, 101s ISBN 80-224-0132-3

Obr.4 , In vitro propagation of *Chamaecyparis obtusa* sieb. et zucc. In *Propagation of ornamental plants* , roč. 10,2010 č. 3, s.119, ISSN 1311-9109

Obr.5 In vitro adventitious shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf-derived callus of *Lagerstroemia speciosa* (L.)pers., In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 3, s.149, ISSN 1311-9109

Obr.6 ,Obr.7 Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation, In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 4, s.205, ISSN 1311-9109

Obr.8 Hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause, In *Propagation of ornamental plants*, roč. 10,2010 č. 4, s.169, ISSN 1311-9109