

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



Katedra botaniky
Školní rok 2010/ 2011

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Využití *in vitro* kultivace nezralých vajíček u vybraných druhů ohrožených
dřevin

Lenka Richterová

Studijní obor: Biologie – Geologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Dagmar Skálová, Ph.D.

Rok odevzdání: 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Dagmar Skálové, Ph.D. a s užitím uvedené použité literatury.

V Olomouci

.....

Lenka Richterová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Dagmar Skálové, Ph.D. za pomoc a velmi užitečné rady nejen při psaní mé bakalářské práce, dále RNDr. Radimu J. Vašutovi, Ph.D. za cenné rady v terénu, RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. a v neposlední řadě mé rodině, která mě během mého studia podporovala.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Lenka Richterová

Název práce: Využití *in vitro* kultivace nezralých vajíček u vybraných druhů ohrožených dřevin.

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, katedra botaniky

Vedoucí práce: RNDr. Dagmar Skálová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Nemožnost přirozeného sexuálního procesu u vybraných druhů rodu *Salix* je jedna z příčin, které zavinily pokles růstu populace nejen v České republice. Jedna z možností, jak tyto dnes již ohrožené druhy zachránit, je využití nezralých vajíček a jejich kultivace pomocí metody „*ovule culture*“. Nezralá vajíčka druhů *Salix herbacea*, *Salix hastata* a *Salix lapponum* se kultivují *in vitro* na vhodných médiích, které podporují růst kalusů a následně jejich organogenezi. Tato metoda umožňuje získat haploidní jedince a následně je využít k dihaploidizaci pomocí polyploidizačních metod, jako je například kolchicinace.

Klíčová slova: kultivace nezralých vajíček („*ovule culture*“), *Salix* sp., kultivační média, *in vitro* metody

Počet stran: 45

Počet příloh: 2

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Autor's name and surname: Lenka Richterová

Title: Utilization of ovule culture in selected threatened species of woody plants.

Type of thesis: bachelor

Institution: Palacký University in Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany

Supervisor: RNDr. Dagmar Skálová, Ph.D

The year of presentation: 2011

Abstract:

The impossibility of the natural sexual process by selected species of genus *Salix* is one of reasons which have caused the degradation of their population growth not only in Czech Republic. One of possibilities how to rescue these endangered species is to use immature ovules and to cultivate them by using the method „*ovule culture*“. Immature ovules of species *S. herbacea*, *S. hastata* and *S. lapponum* are cultivated *in vitro* on appropriate media which support the growth of callus and also their organogenesis. This method enables to get haploids and then to use them for dihaploidisation by polyploidization methods. For example, one of these methods used colchicine as polyploidization reagent.

Keywords: cultivation of immature eggs („*ovule culture*“), *Salix* sp., culture media, *in vitro* methods

Number of pages: 45

Number of appendices: 2

Language: Czech

Obsah:

Seznam obrázků:	8
Seznam tabulek:	9
Seznam příloh:	9
1. Úvod	10
2. Literární přehled	12
2.1. Čeleď vrbovité (Salicaceae)	12
2.1.1. Vrba popelavá (<i>Salix cinerea</i>)	13
2.1.2. Vrba košíkářská (<i>Salix viminalis</i>)	13
2.1.3. Vrba jíva (<i>Salix caprea</i>)	14
2.1.4. Vrba bylinná (<i>Salix herbacea</i>)	14
2.1.5. Vrba laponská (<i>Salix lapponum</i>)	14
2.1.6. Vrba hrotolistá (<i>Salix hastata</i>)	15
2. 2. Charakteristika explantátových kultur rostlin	15
2.2.1. Kultury nezralých vajíček	16
2.2.2. Prašnikové kultury	17
2.2.3. Sterilizace rostlinného materiálu	18
2.2.4. Kultivační média	19
2.2.5. Růstové regulátory	20
3. Materiál a metody	21
3.1. Rostlinný materiál	21
3.1.1. Rostlinný materiál pro hlavní experimenty	22
3.1.2. Rostlinný materiál pro předběžné experimenty	23
3. 2. Sterilizace rostlinného materiálu	23
3. 3. Kultivační média	24
4. Výsledky	26

5. Diskuze	29
6. Závěr.....	32
7. Přílohy	33
8. Přehled použitých zdrojů a literatury	40

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Tabulové skály	22
Obrázek 2: Velká kotlina	23
Obrázek 3: Semeníky <i>Salix hastata</i> (Olympus SP 350)	36
Obrázek 4: Semeník <i>Salix herbacea</i> (Olympus SP 350)	36
Obrázek 5: Semeníky <i>Salix lapponum</i> (Olympus SP 350)	36
Obrázek 6: Semeník s vajíčky <i>Salix hastata</i> (Olympus SP 350)	37
Obrázek 7: Semeník s vajíčky <i>Salix herbacea</i> (Olympus SP 350)	37
Obrázek 8: Semeník s vajíčky <i>Salix lapponum</i> (Olympus SP 350)	37
Obrázek 9: Samičí jehněda <i>Salix hastata</i> (Canon PowerShot A480)	38
Obrázek 10: Samičí jehněda <i>Salix herbacea</i> (Canon PowerShot A480)	38
Obrázek 11: Samičí jehněda <i>Salix lapponum</i> (Canon PowerShot A480)	38
Obrázek 12: Kalus <i>Salix caprea</i> (Olympus SP 350)	39
Obrázek 13: Kalus <i>Salix viminalis</i> (Olympus SP 350)	39

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Roztoky používané ke sterilizaci rostlinných explantátů (<i>Kováč, 1995</i>)	18
Tabulka 2: Přehled složení médií použitých pro kultivaci nezralých vajíček, prašníků a kalusů u rodu <i>Salix</i> spp.	25
Tabulka 3: Výsledky kultivace vajíček a prašníků u rodu <i>Salix</i> spp.	28

Seznam příloh:

Příloha 1: Přehled postupů při sterilizaci rostlinného materiálu a složení médií pro <i>in vitro</i> kultury vajíček (oplozená, neoplozená), semeníků, embryí a prašníků	33
Příloha 2: Fotodokumentace rostlinného materiálu	36

1. Úvod

V současné době se počet ohrožených druhů a poddruhů cévnatých rostlin v České republice blíží k číslu 1 543, což činí asi 60% z celkového počtu volně rostoucích rostlin (Procházka, 2001). Tato čísla nejsou nikdy definitivní, vše závisí na měnících se přírodních podmínkách a také na lidské společnosti. Naštěstí dnes existují různé laboratorní techniky a postupy, kterými lze ohrožené druhy chránit. Jednu z mnoha takových technik lze aplikovat na ochranu a rozšiřování ohrožených druhů vrb, ze kterých jsme si pro tuto bakalářskou práci vybrali následující druhy. Jsou jimi vrba bylinná (*S. herbacea* L.), stupněm ohrožení C1, dále vrba laponská (*S. lapponum* L.) a vrba hrotolistá (*S. hastata* L.), které obě spadají do kategorie C2.

Čeleď vrbovité (Salicaceae) zahrnuje přes 700 druhů, vyskytující se po celém světě, včetně tropických a arktických oblastí, tyto druhy však chybí na Novém Zélandu. Donedávna tvořila tato čeleď samostatný řád, postupem času se však pomocí analýzy chloroplastové DNA (Chase a kol. 2002) potvrdila příbuznost s čeledí Flacourtiaceae. Přesunutím větší části rodů došlo ke vzniku čeledi vrbovité (Salicaceae), jejíž pojmenování zůstalo do dnešní doby zachováno. Taxonomicky dnes čeleď vrbovité (Salicaceae) obsahuje celkem 3 rody: *Salix*, *Populus* a *Chosenia*.

Všechny tyto rody mají společné znaky, které jsou pro ně charakteristické. V jejich kůře se nacházejí glykosidy salicin a populin, které se používají jako přírodní látky k léčbě bolestí a horeček. Většina druhů z rodu *Salix* a *Populus* roste poblíž vod, což by mohla dokládat jedna z teorií původu latinského slova *Salix*. Podle této teorie je slovo *salix* složenina keltských slov *sal*, blízko, a *lis*, voda, tedy vrby rostoucí blízko vody. Další z teorií původu slova *salix* je z latinského *salio*, skáču, což je popis rychlého růstu vrbových prýtů (Šmíd, 2002). Právem se tedy dřeviny z čeledi vrbovité (Salicaceae) řadí do kategorie tzv. rychle rostoucích dřevin, hojně užívaných v oboru lesnictví a zahradnictví. Avšak najdou se i výjimky, jako jsou právě vrba bylinná (*S. herbacea* L.), vrba laponská (*S. lapponum* L.) a vrba hrotolistá (*S. hastata* L.), které se dnes u nás vyskytují poměrně vzácně.

Jelikož jsou v České republice tyto druhy zastoupeny převážně samičími rostlinami, jejich areál přirozeného výskytu se omezil jen na určitá malá území. V subalpínském stupni Hrubého Jeseníku a Krkonoš se nachází vrba laponská (*S. lapponum* L.) a vrba bylinná (*S. herbacea* L.), vrba hrotolistá (*S. hastata* L.) roste už pouze na území Hrubého

Jeseníku. Absence samčích rostlin donutila tyto dřeviny rozmnožovat se převážně vegetativně, a proto je ochrana a kultivace těchto ohrožených druhů na pravém místě.

Jeden ze způsobů, jak tyto druhy zachovat a zároveň vybrat geneticky nejvýhodnější jedince, je využití *in vitro* kultivace nezralých vajíček, tzv. technika „*ovule culture*“. Jelikož se při této metodě pracuje s nezralými vajíčky, je vhodná i k získání haploidních jedinců. Mezi vybranými haploidními rostlinami je poté možnost hledat jedince s žádanými vlastnostmi, které mohou být dále převedeny do dihaploidizovaného stavu. Při tomto procesu, zvaném kolchicinace, se pracuje s mitotickým jodem kolchicinem (nebo jinými mitotickými jedy např.: oryzalin, atd.), který pozastavuje tvorbu dělicího vřeténka za následného vzniku diploidní buňky. V této bakalářské práci se však budeme zabývat počátkem tohoto procesu, což je sterilizace vajíček a následný výběr vhodných kultivačních médií. Tato média budou obohacena o stanovené množství růstových regulátorů, vitamínů a dalších komponent, které napomohou případnému zahájení růstu kalusu, popř. organogenezi.

2. Literární přehled

2.1. Čeled' vrbovité (Salicaceae)

Čeled' vrbovité patří mezi dvouděložné krytosemenné. Taxonomické zařazení této čeledi je následující (Cronquist, 1988):

Říše: rostliny (*Planteae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: dvouděložné rostliny (*Magnoliopsida*)

Podtřída: *Dilleniidae*

Řád: *Salicales*

Čeled': vrbovité (Salicaceae)

Do této čeledi spadá přes 700 druhů, rostoucí na všech místech země, kromě Nového Zélandu. Vrbovité (Salicaceae) zahrnují 3 rody *Salix*, *Populus* a *Chosenia*. Všechny tyto dřeviny jsou převážně dvoudomé a anemochorní, jejich semena jsou rozšiřována pomocí větru. Květy jsou mnohokvěté jehnědy, které jsou důležitým poznávacím znakem při určování jednotlivých druhů. Po oplození jehněd vzniká jednopouzdrá tobolka, která se otevírá 2 – 4 chlopněmi, semena jsou jemně pýřitá (Chmelař a Koblížek, 1990).

Předmětem této bakalářské práce je především rod *Salix* a jeho vybrané druhy. Tento rod má rozšíření téměř na všech místech země. Celkově 500 druhů se vyskytuje po celém světě, z toho v Evropě se nachází přibližně 65 druhů a v České republice je původních 25 druhů vrb. Vrby se vyznačují značnou proměnlivostí tvarů a velikostí [nejmenší dřevinou je právě vrba bylinná (*S. herbacea*)]. Díky rozšiřování semen pomocí větru se mezi vrbami nachází poměrně velké množství hybridů. Tyto dřeviny jsou opadavé, v zimě je jejich určování poměrně obtížné, avšak počátkem vegetačního období je důležité všimnout si jejich hlavních morfologických znaků. Jsou to například tvar a barva jehněd, počet tyčinek, doba květu, tvar čepele listů, barva a počet žilek listů, zbarvení větví a pupenů, barva lýka a mnoho dalších (Vašut, 2006).

Jak už bylo řečeno, vrby můžeme nalézt skoro na všech místech. Jejich nejběžnějším stanovištěm jsou lokality poblíž vod, avšak vyskytují se i ve vyšších nadmořských výškách. Vrby jsou také často označovány jako rychle rostoucí dřeviny (RRD), protože jejich výškový a objemový přírůst vrcholí v první až druhé dekádě růstu a je výrazně vyšší než u většiny hlavních lesních dřevin mírného pásma. Tato biomasa se poté používá například k získání obnovitelné energie (Weger, 2008). Ne všechny druhy však mají takovou schopnost produkce biomasy. V této bakalářské práci se budeme zabývat jak ohroženými druhy, tak i běžnými druhy vrb. Pro upřesnění uvádíme přehled námi vybraných druhů s jejich stručnou charakteristikou.

2.1.1. Vrba popelavá (*Salix cinerea*)

Tato běžná vrba se vyskytuje v celé Evropě, s výjimkou chladného severu a teplého jihu. Roste v lužních lesích, podél vodních toků, dobře snáší stagnující vodu či záplavy. Tento druh je dobře poznatelný jednak díky svému „bochníkovému“ habitu, tak i díky hladké šedé borce. Po sloupnutí kůry se na dřevě nachází viditelné lišty. Samčí květy mají dvě tyčinky, samičí pak stopkatý chlupatý semeník. Tato vrba kvete v dubnu a květnu před rašením listů (Kubát, 2002).

2.1.2. Vrba košíkářská (*Salix viminalis*)

Díky pružnosti mladých prýtů je tento druh velmi často pěstován a následně využíván v košíkářském odvětví. Vrba košíkářská (*S. viminalis*) je typická pobřežní křovina, rostoucí taktéž podél řek a potoků, na březích rybníků a vodních příkopech. Často se vysazuje v nížinách pro zpevnění břehů řek. S tímto druhem se můžeme setkat i v horách, tady je však jen vysazovaná. Větévky mají žlutozelenou až šedou barvu, někdy červenohnědou. Rub listů je většinou hustě chloupkatý, stříbrně lesklé barvy. Samčí jehnědy obsahují dvě tyčinky, samičí květy mají kuželovité, chlupaté semeníky na krátkých stopkách. Vrba košíkářská kvete od března až do května, před vyrašením listů (Koblížek a kol., 2009).

2.1.3. Vrba jíva (*Salix caprea*)

Snad nejznámější druh vrby, v České republice roste hojně na celém území. Vyhovují jí stanoviště jako jsou světlé lesy a lesní okraje, paseky, křoviny, písčiny, opuštěné skládky a mnoho dalších. Roste převážně na suchých stanovištích, špatně se přizpůsobuje nadměrnému množství vody. Poznávacím znakem jsou například na rubu hustě kadeřavě plstnaté listy, nebo borka, která je v mládí hladká, světle šedá, u starých jív pak tmavošedá a hluboce rozpukaná. Samčí květy mají dvě tyčinky, samičí jehnědy obsahují plstnaté či chlupaté semeníky. Tato vrba dorůstá maximálně do výšky 10 – 12 m, kvete v březnu před olistěním (Mikula, 1976).

2.1.4. Vrba bylinná (*Salix herbacea*)

Tato vrba spadá do kategorie chráněných druhů rostlin, stupněm ochrany C1, což ji řadí mezi kriticky ohrožené druhy naší květeny. Tato vrba je nejmenší dřevinou v České republice. Její drobné keříčky dorůstají výšky 2 – 10 cm s plazivými podzemními výběžky. Charakteristická je také svými široce eliptickými listy, které jsou na rubu sytě zelené, lysé a lesklé. Jehnědy jsou krátké, u nás převažují jedinci se samičími jehnědami. Tato vrba obývá vlhké skály, skalní štěrby, sněžná políčka v subalpínském stupni, kvete od června do srpna po vyrašení listů. Vyskytuje se v arktickém a boreálním pásmu Evropy a Severní Ameriky, u nás se dnes vyskytuje již jen na dvou lokalitách, a to v Hrubém Jeseníku a v Krkonoších (Kubát, 2002).

2.1.5. Vrba laponská (*Salix lapponum*)

Další vrbou z kategorie ohrožených druhů rostlin je vrba laponská (*S. lapponum*). Oproti vrbě bylinné (*S. herbacea*) tato vrba patří mezi silně ohrožené rostliny (C2 rostliny) (Procházka, 2001). V České republice se tato vrba nachází opět jen v Hrubém Jeseníku a v Krkonoších, kde můžeme nalézt jen samičí keře. Dále tuto vrbu můžeme nalézt v boreálních a arktických oblastech Evropy a Asie. Roste na bažinných až rašelinitých loukách, ve vysokobylinných nivách v subalpínském stupni. Tato vrba je keřovitého vzrůstu, dorůstá jen do výšky 1 m. Semeníky samičích jehněd jsou zřetelně stopkaté,

chlupaté, listy jsou na rubu hustě stříbřitě plstnaté. Kvete v květnu až červnu zároveň s rašením listů (Kubát, 2002).

2.1.6. Vrba hrotolistá (*Salix hastata*)

Vrba hrotolistá (*S. hastata*) náleží stejně jako vrba laponská (*S. lapponum*) do kategorie silně ohrožených rostlin České republiky. Vyskytuje se v Evropě a Asii, na našem území ji lze nalézt velmi vzácně a to jen na lokalitách v Hrubém Jeseníku. Pro svůj růst si vybírá vlhké sutě, břehy potoků, vysokobylinné nivy a prameniště v subalpínském stupni vegetace (Kubát, 2002). Tento keř dorůstá výšky 1 – 1,5 m, listy jsou eliptické, rub i líc je šedozelené barvy. Jehnědy jsou silně chloupkaté, samčí květy mají 2 lysé tyčinky, samičí jehnědy jsou charakteristické lysými a stopkatými semeníky. Vrba hrotolistá (*S. hastata*), někdy také nazývaná šípovitá, kvete od měsíce května do června, současně s rašením listů (Koblížek a kol., 2009).

2. 2. Charakteristika explantátových kultur rostlin

Využití explantátových kultur rostlin je v současné době, především ve vyspělejších zemích, poměrně běžně užívanou laboratorní metodou k rychlému klonování a šlechtění rostlin.

Tyto metody jsou založeny na izolaci rostlinných buněk, pletiv, orgánů a na jejich kultivaci ve sterilních podmínkách. Jako materiál pro kultivaci *in vitro* je možné teoreticky použít jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem. Mohou to být vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, reprodukční části jako vajíčka, embrya, semena, spory či jen jednotlivé buňky nebo protoplasty (Kováč, 1995). Odebrané části rostlin se následně sterilizují vhodnými roztoky a v aseptickém prostředí převádí na vhodná kultivační média, obohacená o rostlinné hormony a vitamíny.

Následně probíhající morfogeneze buněk *in vitro* závisí na druhu použitého explantátu. Z meristémových kultur, zygotických embryí či diferenciovaných pletiv vznikají postupnou morfogenezí (embryogeneze a organogeneze) intaktní rostliny. Na druhé straně z explantátu na různém stupni diferenciaci mohou vznikat tzv. kalusové kultury, ze kterých lze následně získat např. kultury protoplastové (Novák, 1990). Po určité době kultivace ve vhodných kultivačních místnostech jsou vzniklé rostliny částečně

připraveny na převod z podmínek *in vitro* do podmínek *in vivo*, do vybraného substrátu.

Využití explantátových kultur rostlin v praxi je dnes ve své podstatě neomezené. Jelikož se v této bakalářské práci zabývám ohroženými druhy dřevin, bylo by vhodné uvést příklady praktického využití explantátových kultur dřevin. Tyto explantáty představují vhodný materiál k rozmnožování a uzdravování dřevin, uchování genofondu domácích dřevin, výzkumu genetické proměnlivosti (polyploidie, haploidie) nebo k selekci významných znaků, jako jsou například odolnost proti chorobám, mrazu či pesticidům (Kamenická a kol., 1989). Avšak toto využití neplatí jen pro dřeviny, k těmto účelům se využívají explantáty jakéhokoliv rostlinného původu.

K výzkumu genetické proměnlivosti se už po mnoho let používají haploidní jedinci. Pro metody využívající haploidy nastal obrovský skok před 40 lety, kdy Guha a Maheshwari (1964) zjistili, že haploidní rostliny lze získat z relativně velkého množství nezralých prašníků durmanu neškodného (*Datura innoxia* Mill.). Tato metoda se začala šířit a používat převážně na rodech tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), které se časem staly modelem speciálně pro prašníkové kultury. O pár let později se podařilo získat haploidy i ze samičího gametofytu z více než 30 druhů rostlin. Gynogeneze (získ haploidů z neoplozených vajíček či semeníků) se poté úspěšně začala aplikovat na druhy rostlin, jako jsou např. řepa obecná (*Beta vulgaris* L.), cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.), kde je použití androgeneze neefektivní (Trigiano a Gray, 2008).

2.2.1. Kultury nezralých vajíček

Gynogeneze neboli *in vitro* vývoj neoplozených vajíček či jiných haploidních částí zárodečného vaku, je alternativní metodou pro křížení rostlin. Gynogeneze, využívající techniku kultury vajíček, nám nabízí rychlou a efektivní metodu k produkci homozygotní linie (Garcia a kol., 2009).

Při této metodě se ze sterilních samičích květů v aseptickém prostředí získávají vajíčka, která se poté přemisťují na vhodná kultivační média. Aby byla tato metoda účelná, musí být vajíčka odebrána ještě před oplozením, jenom tím totiž získáme žádoucí haploidní jedince. V semeníku některých rostlin se zakládá pouze jedno vajíčko (*Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*), v jiných dvě (*Galium*) anebo mnoho vajíček (*Papaver*, *Euphorbia*) (Erdelská, 1981).

Rostliny získané gynogenezí mohou být formovány buď nepřímo, pomocí kalusové kultury, nebo přímo, kdy nedochází ke vzniku stádia kalusu (*Garcia a kol., 2009*). Co se týče kultury nezralých vajíček, tzv. techniky „*ovule culture*“, tak při této metodě se nezralé vajíčko nejdříve dediferencuje v haploidní kalus, ze kterého až poté organogenezí vzniká haploidní rostlina (*Kováč, 1995*). Kalusová kultura představuje soubor neorganizované rostoucích buněk, které se po izolaci při pravidelném pasážování mohou kultivovat neomezeně dlouho. Tímto způsobem je za určité období možno získat libovolné množství kalusů, ze kterého po změně živného prostředí dochází k organizovanému růstu za vzniku listů a výhonků (*Kamenická a kol., 1989*). V porovnání s ostatními metodami, využívající rostlinné explantáty, je tato technika nejen vhodná k rychlému rozmnožování, ale především k získání jedinců s poloviční sadou chromozomů. Tito haploidní jedinci představují cenný genetický materiál s praktickou využitelností ve šlechtitelském procesu. Použití haploidního materiálu umožňuje sledování segregace vloh na gametické úrovni a současně dosáhnout dokonale homozygotního stavu již v F₂ generaci (*Novák, 1990*). Stejně jako tato metoda, tak i kultivace prašníků je vhodnou metodou k zachování genotypů ohrožených druhů dřevin.

2.2.2. Prašníkové kultury

Produkce haploidů je velmi cennou metodou v rostlinném šlechtitelství a genetice (*Chaturvedi a kol., 2003*). Kultivací prašníků získáme haploidní rostliny v mnohonásobně vyšší frekvenci, než pomocí jiných experimentálních metod (*Vyskot a kol., 1973*). Převrat v možnosti získávat haploidy ve velkém množství nastal už v roce 1967. Už tehdy Nitschova skupina ve Francii dokázala u sérií druhů *Nicotiana*, že kulturou prašníků *in vitro* na relativně jednoduchých půdách lze skutečně získávat haploidy ve velkém množství (*Landa, 1973*).

V dnešní době existují dvě základní metody odvozování haploidních rostlin z prašníkových kultur. První je pořadí prašík – haploidní rostlina, druhý případ je pořadí prašík – haploidní kalus – haploidní rostlina (*Landa a Kocourek, 1973*). Tento proces vzniku rostliny z prašníků se nazývá androgeneze. Nejčastěji se ke kultivaci používají celé prašíky sterilně vypreparované z pupat ve vhodném vývojovém stádiu. Prašíky se poté pokládají na povrch pevného média či plavou na povrchu tekutého média. Kultivace celých

prašníků má však i své nevýhody. Jde zejména o možnost vzniku rostlin nejen z vlastních mikrospor, ale i ze somatických pletiv prašníků, což má za následek produkci rostlin různého stupně ploidie (Novák, 1990).

2.2.3. Sterilizace rostlinného materiálu

Pod pojmem kultury *in vitro* se vždy jedná o sterilní kultury, ošetřené vhodnými chemikáliemi, které zbaví materiál nežádoucích nečistot. Jednotlivé části rostlin, jako jsou například listy, stonky atd. se celé sterilizují vhodným dezinfekčním roztokem. Naopak pokud se zakládají kultury, které jsou v době zrání uzavřeny v bobulích, malvicích či luskách, musí se nejdříve sterilizovat celé plody (ožehnutím nad plamenem) a semena následně asepticky vyndat (Petrů a kol., 1956). Podobně se postupuje i při kultivaci vajíček a prašníků. Samičí či samčí květy se však nesterilizují opálením nad plamenem, nýbrž se vhodným činidlem obvykle ošetřují celé květy a poté se v aseptickém prostředí vypreparují vajíčka, popř. prašníky.

Roztoky, které se používají ke sterilizaci, nesmí poškodit rostlinná pletiva a musí ničit plísňe a bakterie. Nejpoužívanějšími dezinfekčními činidly jsou především chlorové vápno (zfiltrovaný 4 – 5% roztok), 10 – 15% roztok SAVO Super a roztok Chloraminu B (1 – 5%). Chloramin B se úspěšně používá již od r. 1945 (Petrů a kol., 1956). Účinnost dezinfekce je možné zvýšit přidáním několika kapek detergentu (Jar, Tween – 20). Přehled používaných roztoků ke sterilizaci rostlinného materiálu jsou stručně uvedeny v tabulce (Kováč, 1995).

Tabulka 1: Roztoky používané ke sterilizaci rostlinných explantátů (Kováč, 1995)

sloučenina	koncentrace	Doba působení (minuty)
chlornan vápenatý	9 – 10 %	5 – 30
chlornan sodný	0,5 – 5 %	5 – 30
peroxid vodíku	3 – 12 %	5 – 15
etanol	75 – 95 %	několik s až min.
dusičnan stříbrný	1 %	5 – 30
bromová voda	1 – 2 %	2 – 10
chlorid rtuťnatý	0,1 – 1 %	2 – 10
antibiotika	4 – 5 mg/l	30 – 60

Před použitím dezinfekčního činidla lze snížit počet mikroorganismů omytím povrchu explantátu v saponátu či jej krátkodobě ponořit (cca. 2 minuty) do 70% etanolu. Rostlinný materiál se poté musí zbavit příslušného dezinfekčního roztoku promytím ve sterilní destilované vodě (Kováč, 1995).

Co se týče sterilizace materiálu, určeného pro kultivaci vajíček, prašníků či embryí, postup je následující. Například *Mofidabadi a kol. (1998)* při aplikaci metody „ovule culture“ hybridů rodu *Populus* sp. sterilizovali nejdříve samičí jehnědy po dobu 12 minut v roztoku chlornanu vápenatého a poté byly tyto jehnědy 3 krát promyty po dobu 5 minut destilovanou vodou. Stejný postup byl použit i při pokusech *Kudo a kol. (2008)*, avšak květy pro potřeby kultivace vajíček hybridů rodu *Hydrangea* sp. byly omyty v roztoku chlornanu sodného s přidáním kapky Twenu – 20 po dobu 15 – 20 minut a poté také opláchnuty v destilované vodě.

2.2.4. Kultivační média

Již od počátku byla rostlinná pletiva pěstována na živných půdách, tzv. živných médiích. Hlavní funkcí médií je výživa kultur, což zahrnuje přísun živin a energie při dělení a diferenciaci buněk (*Petrů a kol., 1956*).

Tato média obsahují obvykle makroelementy (dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síra), mikroelementy (mangan, železo, zinek, bor, měď a molybden), aminokyseliny (nebo jiný zdroj organického dusíku), růstové regulátory, zpevňující látky (např. agar, agaróza) a další nedefinované organické složky (Kováč, 1995). Základní složkou kultivačních médií pro explantáty rostlin jsou zdroje uhlohydrátu – cukry. Nejčastěji je dnes používána sacharosa, dále je vhodná glukóza či fruktóza. (Novák, 1990).

Jako zpevňovací složka se nejčastěji používá agar, který se získává z buněčných stěn některých druhů červených mořských řas (např. rody *Gelidium Chondrus*) (Kalina, 1994). Agar má zvláštní postavení, protože je nosičem (koagulační látkou) a současně i látkou aktivní dodávající živiny (Petrů a kol., 1956). Další důležité sloučeniny, které se do médií přidávají, jsou např. gibereliny, kyselina abscisová (ABA), kokosové mléko, kaseinhydrolyzát a adenin. Tyto sloučeniny nejsou v médiích pro růst rostlin důležité, avšak některé kultury tyto látky vyžadují (Thorpe, 1981).

Nejčastěji používanými médii je médium MS (*Murashige a Skoog, 1962*) nebo LS médium (*Linsmaier a Skoog, 1965*). Tato média se používají zejména tehdy, je-li cílem kultivace regenerace rostlin. B5 médium (*Gamborg, 1968*) a jeho různé deriváty se používají především pro kultivaci protoplastů a buněčných suspenzí. Hlavním rozdílem mezi MS a B5 médiem je mnohem nižší obsah dusíku, zejména nitrátu v B5 médiu. Pro prašnickové kultury, především obilovin, bylo odvozeno médium N6 (*Chu, 1978*), které je i dnes s úspěchem využíváno nejen u obilovin, ale i u ostatních typů tkáňových kultur (*Kováč, 1995*). Zatímco médium MS obsahuje velké množství nitrátu a také amoniaku, tzv. White's médium (*White, 1963*) neobsahuje amoniak žádný, jelikož vysoké koncentrace amoniaku redukuje v některých rostlinných systémech růst buněk. SH médium (*Shenk a Hildebrandt, 1972*) se podobá médiu B5 a to přítomnosti vysokých koncentrací solí. Také LS médium může být použito pro regeneraci rostlin, stejně jako MS médium, avšak rozdíl mezi těmito médii je v rozdílné koncentraci vitamínů a organických látek (*Thorpe, 1981*).

Pro kultivaci vajíček, prašníků, semeníků nebo embryí se do dnešní doby vyzkoušelo nepřeberné množství druhů médií s relativně pozitivními výsledky. Například *Popielarska M. (2005)* pro kultivaci vajíček slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*) použila MS médium doplněné o stanovené množství růstových regulátorů, vitamínů atd. Přehled vybraných médií pro kultivaci prašníků, vajíček (oplozená, neoplozená), semeníků a embryí uvádíme v Příloze 1.

2.2.5. Růstové regulátory

Nezbytným činitelem při růstu rostliny jsou růstové regulátory, které ovlivňují průběh biochemických pochodů v rostlině. Vytvořením různých podmínek výživy můžeme např. růst zrychlit a zpomalit vývoj. Rostlina pak vytváří jen listy, ale nekvete. Změnou podmínek vnějšího prostředí je možné urychlit vývoj a zpomalit růst. Rostlina záhy kvete a zůstává přitom trpasličí (*Řetovský, 1953*).

Růstové regulátory se do kultivačních médií přidávají jako tekuté roztoky buď před jejich sterilizací, nebo až po sterilizaci, jelikož některé regulátory nesnesou vysoké teploty (např. gibereliny, IAA atd.). Tyto chemické látky se mohou vyskytovat v rostlinném těle přirozeně nebo se mohou připravovat synteticky. Přirozené regulátory růstu lze rozdělit do dvou skupin: rostlinné hormony (fytormony) a další látky s regulační aktivitou.

Existuje pět skupin, které patří mezi rostlinné hormony. Jsou to auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a etylen, z čehož první tři skupiny mají stimulační funkci, zatímco kyselina abscisová a etylen funkci inhibiční. Mimo ně se v rostlinném těle nachází i velké množství látek s růstově regulační aktivitou. Tyto látky se mezi hormony neřadí, neboť jsou účinné ve vyšších koncentracích či neznáme dostatečně obecnost jejich působení. Jsou to například brassinosteroidy, polyaminy nebo fenolytické látky. Auxiny mohou být jak organického původu např. IAA (kyselina indolyloctová), IBA (kyselina indolylmásečná), PAA (kyselina fenyloctová) nebo mohou být vytvořeny synteticky např. NAA (kyselina naftyloctová) či 2,4 – D (kyselina 2,4 – dichlorfenoxyoctová). Cytokininy jsou deriváty adeninu. Z nejznámějších a nejúčinnějších jsou bezesporu BA (6-benzyladenin), KIN (kinetin) a zeatin. Auxiny a některé cytokininy jsou důležité pro zahájení dělení buněk a tvorbu kalusu, také k indukci tvorby kořenů a prýtů. Neefektivněji působí 2,4 – D, dále také ze skupiny auxinů NAA (kyselina naftyloctová) a IBA (kyselina indolylmásečná). Mezi nejznámější gibereliny patří GA₃, které také stimuluje růst prodlužovací, zejména nadzemních částí rostlin. Kyselina abscisová (ABA) má v rostlinách naopak inhibiční účinek, stimuluje opad, urychluje stárnutí či reguluje dormanci. Etylen, jediný dosud známý plynný hormon, má také v rostlinném těle převážně inhibiční účinek, pozastavuje prodlužovací růst nebo urychluje zrání plodů. (Procházka a kol., 1998).

3. Materiál a metody

3.1. Rostlinný materiál

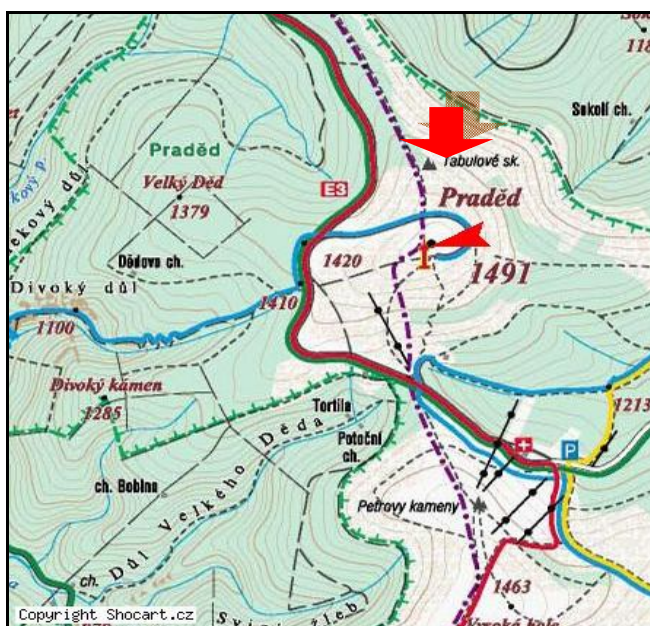
Pro účely této bakalářské práce byly využity samičí květy (jehnědy) vrby bylinné (*S. herbaceae*), vrby laponské (*S. lapponum*) a vrby hrotolisté (*S. hastata*). Pro předběžné pokusy byly použity nejen samičí jehnědy, ale i jehnědy samčích rostlin běžně se vyskytujících vrb [např. vrba košíkářská (*S. viminalis*), vrba popelavá (*S. cinerea*) a vrba jíva (*S. caprea*)].

3.1.1. Rostlinný materiál pro hlavní experimenty

Již zmíněné ohrožené druhy se nachází na území Hrubého Jeseníku. Sběr jehněd proběhl v polovině měsíce května 2010, kdy se na lokalitách stále nacházela sněhová pokrývka. Samičí květy vrby bylinné (*S. herbacea*) a vrby laponské (*S. lapponum*) byly sbírány na lokalitě Tabulové skály (obrázek 1), která je součástí NPR Praděd. Na území naučné stezky Velká kotlina se naopak vyskytuje vrba hrotolistá (*S. hastata*), ze které bylo taktéž odebráno několik samičích květů (obrázek 2).

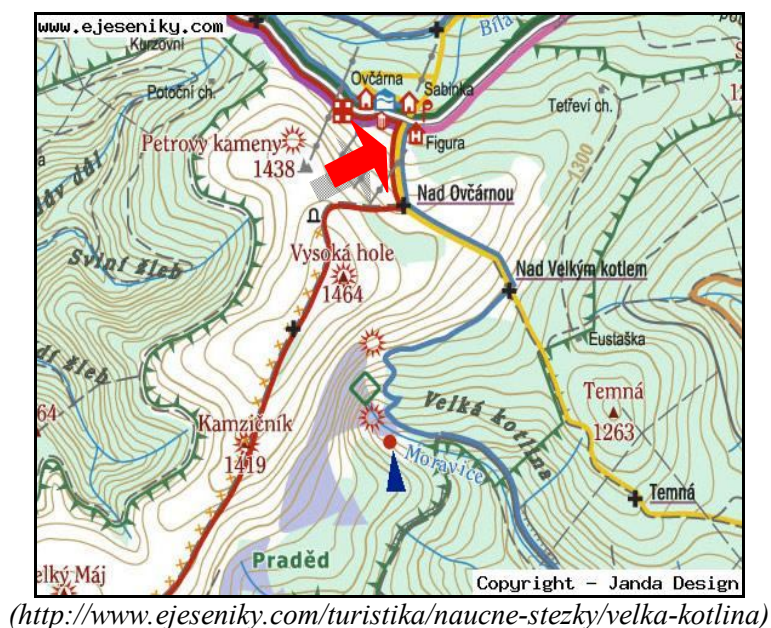
Jednotlivé jehnědy chráněných vrb se lišily jak svým celkovým vzhledem, tak i velikostí a mírou ochlupení semeníků (Příloha 2, obrázky 3 - 5). Nejmenší a lysé semeníky, v rozmezí 0,5 - 1 mm, měla vrba bylinná (*S. herbacea*), naopak největší (až 7mm) a zároveň nejvíc ochlupené semeníky měly jehnědy vrby laponské (*S. lapponum*). Semeníky vrby hrotolité (*S. hastata*) byly lysé a dosahovaly velikosti téměř shodné s vrbou laponskou (*S. lapponum*), tedy až 7 mm. V jednotlivých semenících se po otevření preparační jehlou nacházel různý počet vajíček cca 5 – 10 (Příloha 2, obrázky 6 - 8). Úměrně k velikostem semeníků byly i velikosti samotných jehněd (Příloha 2, obrázky 9 - 11). Vrba bylinná (*S. herbacea*) měla velice drobné a sytě zelené jehnědy, bez ochlupení, které měly v průměru 5 mm, naopak jehnědy vrby laponské (*S. lapponum*) a vrby hrotolité (*S. hastata*) byly typicky ochlupené a dosahovaly velikosti od 2,0 – 3,5 cm.

Obrázek 1: Tabulové skály



(<http://www.jeseniky.net/sluzby/banky/index.php?obl=1&kat=11&sluz=81&pol=2820>)

Obrázek 2: Velká kotlina



3.1.2. Rostlinný materiál pro předběžné experimenty

Aby bylo při práci v hlavních experimentech dosaženo co nejlepších výsledků, bylo nám umožněno vyzkoušet si vybrané postupy na květech běžně rostoucích vrb. Pro tyto pokusy byly použity jak jehnědy samičí, tak i samčí, a to jehnědy vrby košíkářské (*S. viminalis*), vrby popelavé (*S. cinerea*) a vrby jívy (*S. caprea*). Vypreparovaná nezralá vajíčka a prašníky byly použity na prověření sterilizačních a preparačních postupů a následně převedeny na vybraná média.

3. 2. Sterilizace rostlinného materiálu

Z terénu odebraný rostlinný materiál byl před vlastní manipulací pečlivě desinfikován vhodnými činidly. Pro lepší manipulaci byly jehnědy vloženy do uhlonové sítě a následně do plastových injekčních stříkaček. Poté mohl začít samotný proces sterilizace. Pro naše účely byl vybrán následující postup.

Prvním krokem bylo ošetření jehněd 70% etanolem, který působil 1 min a to kvůli zvýšení smáčivosti povrchu materiálu. Po uplynutí této doby byl etanol odstraněn, dále byl rostlinný materiál opláchnut 2,5% chloraminem s kapkou Tweenu- 20, pro lepší účinnost

desinfekce. Chloramin působil na jehnědy 10 min a následně byly jehnědy propláchnuty 3x ve sterilní destilované vodě.

Samotný proces preparace vajíček popř. prašníků byl zahájen v aseptickém prostředí speciálních boxů s prouděním sterilního vzduchu (flow- box). Semeníky a prašníky byly z květů odděleny pomocí preparačních jehel a pinzet. Při preparaci rostlinného materiálu byla použita binokulární lupa (Olympus SZ51). Takto vypreparovaná vajíčka a prašníky byly přemístěny do Petriho misek na připravená média (vždy 10 vajíček, popř. prašníků na jednu Petriho misku).

3. 3. Kultivační média

Pro hlavní i předběžné experimenty byla vybrána média, která se používají při kultivaci prašníků a vajíček různých druhů rostlin. Pro kultivaci nezralých vajíček byla použita tato média: médium 1. (*Calagari a kol., 2004*), médium 2. (*Popielarska, 2005*), médium 3. (*Scheiber a kol., 2003*), médium 4. (*Agrawal a Gebhardt, 1994*) a médium 5. (*Suprunova a Shmykova, 2008*). Ke kultivaci prašníků bylo taktéž použito médium 2. (*Popielarska, 2005*), dále médium 4. (*Agrawal a Gebhardt, 1994*), médium 6. (*Suprunova a Shmykova, 2008*) a médium 7. (*Keller a kol., 1975*). Pro kultivaci kalusů jsme použili médium 8. (*Pelletier a kol., 1983*). Přesné složení těchto médií je přehledně zobrazeno v Tabulce 2. Tato média byla připravena standardními postupy a následně sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizačního procesu u médií byla 30 min.

Média jsme po sterilizaci ve větších nádobách (500 ml) rozlili do menších misek a to z důvodu lepšího uskladnění. Pro naši práci byly použity Petriho misky o průměru 60 mm. Po přenesení rostlinného materiálu na kultivační média se Petriho misky zalepují parafilmem, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Takto zabezpečené misky se poté přemístí do termostatu, kde se vzorky kultivují ve tmě při teplotě 27°C po dobu 2 – 3 měsíců.

Tabulka 2: Přehled složení médií použitých pro kultivaci nezralých vajíček, prašníků a kalusů u rodu *Salix* spp.

Médium	Složení	Reference
1.	○ MS médium + 30 mg/l sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,8	<i>Calagari a kol.</i> (2004)
2.	○ MS médium + 500 mg/l kaseinhydrolyzát; 4 mg/l IAA; 0,5 mg/l kinetin; 5 mg/l GA₃; 9,5 mg/l glycin; 3% sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,8	<i>Popielarska</i> (2005)
3.	○ WPM (<i>Lloyd a McCown, 1981</i>) médium + WPM vitamíny; 50 ml/l kokosové mléko; 3% sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,5-5,6	<i>Scheiber a kol.</i> (2003)
4.	○ SH médium + 0,2 mg/l BA; 20mg/l sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,8	<i>Agrawal a Gebhardt</i> (1994)
5.	○ MSm (<i>Matsuda a kol., 1981</i>) médium + 0,2 mg/l TDZ; 0,2 mg/l IBA; 5% sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,6- 5,8	<i>Suprunova</i> <i>a Shmykova (2008)</i>
6.	○ MSm médium + 100 mg/l serin; 800 mg/l glutamin; 2 mg/l 2,4D; 1 mg/l BA, 8% sacharosa; 0,8% agar ○ Ph: 5,6- 5,8	<i>Suprunova</i> <i>a Shmykova (2008)</i>
7.	○ B5 médium + 10% sacharosa; 2mg/l NAA; 1 mg/l BA; 0,8% mg/l agar ○ Ph: 5,6- 5,8	<i>Keller a kol.</i> (1975)
8.	○ MS médium + 0,5 mg/l BAP; 0,1 mg/l NAA; 8 g/l agar; 10 g/l sacharosa ○ Ph: 5,6- 5,8	<i>Pelletier a kol.</i> (1983)

4. Výsledky

Pro tuto bakalářskou práci byly ke kultivaci nezralých vajíček záměrně vybrány takové druhy dřevin, jejichž areál přirozeného výskytu se začíná neustále zmenšovat. Právě proto je kultivace těchto vajíček, s následným možným získáním haploidních jedinců, důležitá v dalších etapách zkoumání. Haploidní rostliny je možno získat také z prašníků, proto jsme využili prašníky z běžně rostoucích vrb k tomu, abychom zjistili, jaké postupy jsou pro tyto pokusy nejlepší. Pro dosažení nejlepších výsledků bylo potřeba kultivovat na živných médiích co nejvíc vajíček, popř. prašníků. Jelikož odběr jehněd z ohrožených vrb je omezen určitým množstvím, bylo důležité využít všechn dostupný materiál. Všechny naše výsledky jsou detailně rozepsány v následujícím textu a navíc přehledně zobrazeny níže v Tabulce 3.

Z jehněd vrby hrotolité (*S. hastata*) bylo vypreparováno a následně kultivováno celkem 400 vajíček. Nezralá vajíčka byla kultivována na 4 typech médiích, vždy deset vajíček na jednu Petriho misku. Po uplynutí 3 – 4 měsíců nedošlo k žádné změně ve vývoji. Stejně výsledky byly vypořovány i u kultivovaných vajíček vrby laponské (*S. lapponum*), z počtu 570- ti vajíček nedošlo ani v jednom případě k regeneraci explantátu. Naopak u vajíček vrby bylinné (*S. herbacea*) byly po 3 - 4 měsících vyhodnoceny rozdílné výsledky. Z celkového počtu 400 vajíček došlo u 80- ti kultivovaných explantátů k nekrotizaci materiálu, projevující se zčernáním nasazených vajíček. U dalších 40- ti vajíček byla upozorována změna ve velikosti explantátu, avšak bez tvorby kalusu, a to jen na médiu 2. (Popielarska, 2005) (Tabulka 3). Zbylých 280 vajíček vrby bylinné (*S. herbacea*) nevykazovaly žádnou regeneraci ve vývoji.

U předběžných experimentů jsme nepracovali s tak velkým počtem explantátů, jelikož šlo pouze o zkušební vzorky. Nicméně i z těchto experimentů jsou zpracovány výsledky (Tabulka 3). Ze samičích i samčích jehněd vrby jívy (*S. caprea*) bylo použito pro kultivaci 60 prašníků a 30 vajíček, z čehož u vajíček nedošlo po 4 měsících k žádné viditelné změně. U prašníků byly po uplynutí stejné doby pozorovány změny ve velikosti bez tvorby kalusu, a to u 25 kultivovaných explantátů. Z jednoho prašníku vyrostl viditelný kalus (≥ 2 mm) (Příloha 2, obrázek 12) a u 4 explantátů došlo k tvorbě mikrokalusů (≤ 2 mm). Získaný kalus (≥ 2 mm) jsme následně přemístili na jiný typ živného média – na

médium 8. (*Pelletier a kol., 1983*). Růst či změna kultivovaných prašníků vrby jívy (*S. caprea*) nejlépe probíhal na médiu 7. (*Keller a kol., 1975*). Zbylých 30 prašníků této vrby nevykazovaly žádnou regeneraci.

Další explantáty byly odebrány z jehněd vrby popelavé (*S. cinerea*). Stejně jako u předchozího druhu, tak i u této vrby se kultivovala jak vajíčka, celkově 60 explantátů, tak i prašníky - 80 explantátů. Po uplynutí doby potřebné ke kultivaci nebyla ani u jednoho z explantátu vyzorována jakákoliv změna ve velikosti či vzhledu.

Posledním rostlinným materiálem pro předběžnou práci byla vajíčka a prašníky jehněd vrby košíkářské (*S. viminalis*). Z celkového počtu 100 prašníků byl u jednoho kultivovaného explantátu zaznamenán růst kalusu (≥ 2 mm) (Příloha 2, obrázek 13). Tento viditelný kalus byl přemístěn na médium 8. (*Pelletier a kol., 1983*). U dalších 19- ti explantátů došlo ke změně velikosti bez tvorby kalusu. Všechny tyto změny v růstu proběhly na médiu 7. (*Keller a kol., 1975*). U zbylých 80- ti prašníků nebylo viditelné jakékoliv zvětšení či tvorba kalusu. Po 3 – 4 měsících byla vyhodnocena regenerace kultivovaných vajíček vrby košíkářské (*S. viminalis*), celkem 80 explantátů. U 40- ti kultivovaných vajíček nedošlo k žádné viditelné regeneraci, 20 vajíček nekrotizovalo a u 20- ti vajíček došlo k pravděpodobné tvorbě mikrokalusů (≤ 2 mm). Tyto změny probíhaly na médiu 2. (*Popielarska, 2005*).

Tabulka 3: Výsledky kultivace vajíček a prašníků u rodu *Salix* spp.

Genotyp	Typ explantátu	Médium	Počet kultivovaných explantátů	Úroveň regenerace po 3 – 4 měsících
<i>S.hastata</i>	vajíčka	1.	100	100 (0)
		2.	100	100 (0)
		3.	100	100 (0)
		4.	100	100 (0)
<i>S.herbacea</i>	vajíčka	1.	100	80 (0), 20 (N)
		2.	100	60 (0), 40 (Z)
		3.	100	80 (0), 20 (N)
		4.	100	60 (0), 40 (N)
<i>S.lapponum</i>	vajíčka	1.	150	150 (0)
		2.	160	160 (0)
		3.	110	110 (0)
		4.	150	150 (0)
<i>S. caprea</i>	vajíčka	4.	30	30 (0)
	prašníky	2.	30	30 (0)
		7.	30	25 (Z), 4 (MK), 1 (K)
<i>S. cinerea</i>	vajíčka	1.	10	10 (0)
		2.	20	20 (0)
		3.	10	10 (0)
		4.	10	10 (0)
		5.	10	10 (0)
	prašníky	2	20	20 (0)
		4.	30	30 (0)
		6.	30	30 (0)
<i>S. viminalis</i>	vajíčka	2.	40	10 (0), 10 (N), 20 (MK)
		3.	10	10 (0)
		4.	10	10 (0)
		5.	20	10 (0), 10 (N)
	prašníky	2.	20	20 (0)
		7.	40	20 (0), 19 (Z), 1 (K)
		6.	40	40 (0)

Popis použitých zkratk: 0 - žádná změna explantátu během kultivace, N - nekrotizace explantátu, Z - zvětšení explantátu bez tvorby kalusu, MK - mikrokalus ($\leq 2\text{mm}$), K - kalus ($\geq 2\text{ mm}$)

5. Diskuze

Kultivace různých částí rostlin je dnes již běžně používanou technikou ke zkoumání druhů, jejich šlechtění, rozmnožování či ozdravování. Z tohoto důvodu je dnes možné najít nepřeberné množství vědeckých článků, popisující postupy a techniky při kultivaci rozdílných explantátů různých druhů rostlin. Na základě těchto publikací jsme dokázali shromáždit potřebná data, která nám pomohla vysvětlit odlišnosti ve výsledcích různých kultivací nezralých vajíček a prašníků.

Pro naši práci jsme si z vědeckých publikací vybrali média, na kterých probíhala regenerace explantátů s nejlepšími výsledky. Jako první jsme vyzkoušeli médium použité v práci *Calagari a kol. (2004)* při mezidruhovém křížení různých genotypů *Populus euphratica* Oliv. Při této kultivaci bylo použito MS médium - pouze s 30% sacharosou, na kterém byla následně kultivována oplozená vajíčka a semeníky těchto kříženců. Výsledkem byla 34% úspěšnost růstu rostlinek u kultur semeníků a větší úspěšnost u kultur oplozených vajíček a to 47,46 %. Na základě těchto výsledků a příbuznosti rodů *Populus* a *Salix* jsme vyzkoušeli tento typ média, který však pro růst nezralých vajíček druhů *S. hastata*, *S. herbacea*, *S. lapponum* a *S. cinerea* nebyl vhodný, úspěšnost byla 0 %. Tuto neúspěšnost si vysvětlujeme mimo jiné i tím, že *Calagari a kol. (2004)* použili pro kultivaci již oplozená vajíčka, která mají rozdílnou schopnost regenerace než vajíčka neoplozená. Hlavní příčinou rozdílných výsledků je podle našeho názoru především rozdílný genotyp použitého rostlinného explantátu.

Jako druhé médium jsme se rozhodli vyzkoušet modifikované médium MS, které využila pro svou práci *Popielarska (2005)*. Pro kultivaci *in vitro* byla využita oplozená vajíčka rodu *Helianthus annuus* L. Modifikované MS médium bylo doplněno o přesné množství růstových regulátorů (Tabulka 2). Správný poměr těchto růstových regulátorů by měl potenciálně zahájit organogenezi oplozených vajíček. Úspěšnost regenerace byla však nízká, rostlinky byly získány z pouhých 2,3 % a různých stupňů vývoje embryí bylo dosaženo z 2,5 %. Naše výsledky byly odlišné. Z celkového počtu 420 nezralých vajíček různých druhů vrb bylo dosaženo u 4,7 % vajíček regenerace ve formě mikrokalusů a to u vrby jívy (*S. viminalis*). Tato změna v regeneraci vajíček vrb odráží odlišné složení použitého média, které bylo doplněno o růstové regulátory, které indukovali buněčné dělení a následnou tvorbu mikrokalusů.

Ve vědeckých experimentech se pro kultivaci explantátových kultur často používá médium WPM. Toto médium použili při svých pokusech např. *Scheiber a kol. (2003)* a to ke kultivaci vajíček hybridů *Abelia grandiflora* 'Francis Mason' × *A. schumannii*. Tento typ média jsme si pro naši práci vybrali kvůli tomu, že obsahuje mimo jiné i kokosové mléko, které má velice pozitivní vliv na regeneraci vajíček nebo embryí. Médium jsme doplnili WPM vitamíny a nepřidávali žádné růstové regulátory. Úspěšnost regenerace vajíček hybridů rodu *Abelia* sp. byla stanovena na 44 %, kdy došlo k tvorbě kořínků. Při našich pokusech nedošlo k žádné regeneraci, úspěšnost byla 0 %. Tuto neúspěšnou regeneraci si vysvětlujeme rozdílnými genotypy rostlin. V našich pokusech jsme použili explantáty rodu *Salix* spp., kdežto *Scheiber a kol. (2003)* kultivovali explantáty z rostlin rodu *Abelia* sp. Rozdílné výsledky ovlivnil také stupeň vývoje izolovaných vajíček (oplozená, neoplozená). WPM médium se také často používá ke kultivaci adventivních pupenů či nodálních segmentů nejen lesních dřevin. V České republice se mikropropagací dřevin úspěšně zabýval Prof. Ing. Vladimír Chalupa, DrSc. Kokosové mléko použili při svých experimentech také *Takeshita a kol. (1980)*. Do základního White's média přidali mimo jiné i stejný poměr NAA a kinetinu (2,5 mg/l). Na tomto médiu poté kultivovali oplozená vajíčka hybridů *Brassica* sp. a *Raphanus* sp. Úspěšně vyklíčená embrya a získané kalusy následně přemístili na jiný typ kultivačního média.

Osvědčeným médiem pro kultivaci částí rostlin je také médium SH. Toto médium využili při svých pokusech například *Agrawal a Gebhardt (1994)*, a to k hybridizaci druhů *Salix* sp. (*S. fragilis* × *S. lispolados*). Na médiu SH, doplněném o 0,2 mg/l BA, kultivovali semeníky hybridů vrb. Regenerace proběhla úspěšně, došlo k zakořenění výhonků a po určité době k vysazení hybridních rostlin na pokusné pole. Takto upravené médium jsme také využili pro kultivaci nezralých vajíček a prašníků vybraných druhů vrb, avšak bez pozitivních výsledků. Jelikož šlo o stejný rod *Salix* sp., neúspěch našich experimentů se pravděpodobně odvíjí od vývojového stavu kultivovaných vajíček. Pro dosažení pozitivních výsledků u prašníků by byla potřeba kultivace většího počtu těchto explantátů. Kultivace embryí, získaných hybridizací mezi rody *Salix* sp. a *Populus* sp., využili také *Zenkter a kol. (2005)*. Jak se uvádí v jejich práci, šlechtění a následné pěstování mezidruhových hybridů je čím dál více žádanější, díky rychlé produkci biomasy s následným využitím k výrobě energie či vláken. Tato embrya dále kultivovali na MS médiu s poloviční koncentrací makroelementů. Vzniklé globulární a srdčité fáze embryí byly vypořizovány u všech kříženců. Autoři poukazují na skutečnost, že použitím

technologie *in vitro* kultivace mohou překonat překážky neslučitelnosti rodů *Salix* sp. a *Populus* sp.

Kultivace oplozených vajíček či embryí je běžně používanou laboratorní technikou, stejně jako využití nezralých vajíček. Například *Suprunova a Shmykova (2008)* využily neoplozená vajíčka druhu *Cucumis sativus* k zahájení gynogeneze. Z deseti testovaných kultivarů se regeneroval pouze jeden a to na médiu MSm (*Matsuda a kol., 1981*) doplněné o 5% sacharosu a růstové regulátory TDZ a IBA. Maximální regenerace na tomto médiu byla 3,5 %, ostatní kultivary degenerovaly. Po přemístění na jiný typ média vyhodnotily růst životaschopných rostlinek pouze z 0,5 %. Tyto rostliny se od donorových rostlin lišily ve velikosti listů a také v rozdílné barvě a typu květů. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli vyzkoušet tento typ média ke kultivaci nezralých vajíček vrby popelavé (*S. cinerea*) a vrby košíkářské (*S. viminalis*). Regenerace vajíček na tomto médiu byla 0 %. Takto negativní výsledek kultivace přisuzujeme rozdílnému genotypu donorové rostliny, ze kterého byl explantát odebrán. Pro lepší výsledky by také bylo vhodné kultivovat větší počet nezralých vajíček. *Suprunova a Shmykova (2008)* kultivovaly také prašníky a mikrospory z druhu *Cucumis sativus*. Na stejném médiu MSm, avšak s 8% sacharosou doplněné přesným množstvím růstových regulátorů (Tabulka 2), kultivovaly prašníky, ze kterých úspěšně získaly kalusové kultury. Autorky v závěru poukazují na skutečnost, že využití mikrosporových kultur je k získání haploidních rostlin rodu *Cucumis* sp. efektivnější, než kultivace kultur prašníkových. Jelikož jsme v našich pokusech také pracovali s prašníky, použili jsme ke kultivaci výše zmíněné médium *Suprunova a Shmykova (2008)*. Na tomto médiu jsme kultivovali prašníky vrby popelavé (*S. cinerea*) a vrby košíkářské (*S. viminalis*), úspěšnost regenerace explantátů však byla 0 %. Tento výsledek byl také jako u vajíček ovlivněn rozdílným genotypem a malým množstvím kultivovaných explantátů.

Na závěr bych chtěla připomenout, že výsledky všech uvedených studií, včetně našich experimentů, vždy závisí na mnoha faktorech. Jak jsme sami zjistili, úspěšnost gynogeneze závisí především na genotypu rostliny, ze kterého byl rostlinný explantát odebrán. Podle *Garcia a kol. (2009)* jsou dalšími faktory např. stupeň vývoje zárodečného vaku, typ média a růstových regulátorů nebo ekologické podmínky mateřské rostliny.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt nejvhodnější sterilizační postupy a složení médií, které by vedly k úspěšné regeneraci *in vitro* kultivovaných nezralých vajíček a prašníků ohrožených a také běžněji rostoucích druhů vrb. V této práci jsem se mimo jiné zaměřila na shromažďování literárních údajů a vypracování literární rešerše k zadané problematice. Dalším cílem bylo zvládnutí techniky explantátových kultur rostlin (sterilizace rostlinného materiálu, příprava kultivačních médií, izolace a kultivace nezralých vajíček, popř. prašníků). V neposlední řadě bylo důležité všechny naše výsledky přehledně zpracovat a vytvořit odpovídající fotodokumentaci rostlinného materiálu.

Ze shromážděných vědeckých článků jsme zjistili, že kultivace explantátových kultur je dnes běžně používanou technikou k ozdravování rostlin, jejich šlechtění či rychlému namnožení, k záchraně ohrožených druhů rostlin a k získání haploidních jedinců. Úspěšnou kultivací nezralých vajíček ohrožených druhů vrb (*S. herbacea*, *S. lapponum*, *S. hastata*) a kultivací prašníků druhů *S. caprea*, *S. viminalis* a *S. cinerea* by bylo možné získat důležité kalusové kultury. Tyto kultury by se následně kultivovaly na jiných typech živných médií, které by podpořily jejich následnou organogenezi. V této bakalářské práci jsme vyzkoušeli celkem 7 typů médií s přidáním odlišných růstových regulátorů a dalších důležitých komponent.

Vzhledem k absenci samčích rostlin ohrožených druhů vrb by byl zisk kalusů z nezralých vajíček důležitým a podstatným krokem pro další studie. V naší práci jsme však nedocílili úspěšných výsledků kultivace nezralých vajíček. Pro lepší výsledky by byla potřeba vyzkoušet více typů médií a také kultivovat větší množství vajíček (cca. 1000 vajíček/druh). Kultivace prašníků se jevila úspěšnější, z celkového počtu 240 prašníků jsme získali 2 kalusy o velikosti (≥ 2 mm) a to z jehněd vrby jívy (*S. caprea*) a vrby košíkářské (*S. viminalis*). Tyto kalusy byly přemístěny na kultivační médium 8. (*Pelletier a kol.*, 1983). Je zde možnost s nimi dále pracovat a zahájit potenciální organogenezi.

Tato práce může tvořit základ pro další výzkumy v rámci kultivací explantátových kultur u rodu *Salix*. Úspěšné získání haploidních rostlin by bylo navíc důležité pro studium v rámci molekulární biologie.

7. Přílohy

Příloha 1: Přehled postupů při sterilizaci rostlinného materiálu a složení médií pro *in vitro* kultury vajíček (oplozená, neoplozená), semeníků, embryí a prašníků

Typ explantátu / genotyp	Postup	Reference
oplozená vajíčka/ hybridi brukev × ředkev setá (<i>Brassica sp.</i> × <i>Raphanus sativus</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlornan sodný (6,4%); destilovaná voda ○ <u>Ph</u>: 6,5 ○ <u>Médium</u>: White's agar médium + 150 ml/l kokosové mléko, 2,5 mg/l NAA; 2,5 mg/l kinetin	<i>Takeshita a kol. (1980)</i>
oplozená vajíčka + semeník/ hybridi topol bílý × topol eufratský (<i>P.alba</i> × <i>P. euphratica</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlornan vápenatý (12 min), destilovaná voda (3x ; 5 min) ○ <u>Ph</u>: 5,8 ○ <u>Médium</u>: ½ MS + FeEDTA 10⁻⁴ M; 0,16M a 0,17M sacharosa	<i>Mofidabaldi a kol. (1998)</i>
oplozená vajíčka + semeník/ topol eufratský (<i>Populus euphratica</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlornan vápenatý (12 min), destilovaná voda (3x ; 5 min) ○ <u>Médium</u>: MS, ½ MS, DKW + 20 mg/l a 30 mg/l sacharosa	<i>Calagari a kol. (2004)</i>
prašníky/ tabák virginský (<i>Nicotina tabacum</i>)	○ Sterilizace: ethylen (30s; 70 %), chloramin (5 min; 10%), destilovaná voda (3x) ○ <u>Médium</u>: LS + a) 0,1 mg/l IAA; 0,1 mg/l NAA b) 0,5 mg/l IAA; 0,1 mg/l kinetin	<i>Opatrný (1973)</i>
embrya/ lípa velkolistá (<i>Tilia platyphyllos</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlornan vápenatý (7,5% ; 20 min), destilovaná voda (2x) ○ <u>Médium</u>: MS + 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l 2-4-D; 0,5; 0,1 mg/l BA; 200 mg/l kaseinhydrolyzát; 200 mg/l glutamin	<i>Chalupa (2003)</i>

Typ explantátu / genotyp	Postup	Reference
oplozená vajíčka/ slunečnice roční (<i>Helianthus annuus</i> L.)	○ <u>Sterilizace</u>: zředěné SAVO (10min), destilovaná voda (3x) ○ <u>Ph</u>: 5,8 ○ <u>Médium</u>: MS médium + a) 4 mg/l IAA; 0,5mg/l kinetin; 500 mg/l kaseinhydrolyzát; 5 mg/l GA₃; 9,5 mg/l glycin; 0,8% agar; 3% sacharosa; b) 0,5 mg/l IAA; 0,5mg/l kinetin; 500mg/l kaseinhydrolyzát; 4mg/l GA₃; 7,5mg/l glycin; 3% sacharosa; 0,8% agar	<i>Popielarska (2005)</i>
oplozená vajíčka/ lilie dlouhokvětá (<i>Lilium longiflorum</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: ethanol (1 min; 70%), chlorid rtuťnatý (10 min; 1%), destilovaná voda (3x) ○ <u>Ph</u>: 6,0 ○ <u>Médium</u>: B5 a ½ B 5 + 3%; 6%; 9% sacharosa; 0,8% agar	<i>Wang a kol. (2009)</i>
vajíčka/ bavlník (<i>Gossypium sp.</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlorid sodný + Tween (5 min; 0,5%), destilovaná voda (4x) ○ <u>Médium</u>: - SH + 0,1 mg/l IAA; 1,0 mg/l kinetin; 0,5 mg/l GA₃; 4% sacharosa; 0,7% agar - MS + Gamborg B5 vitamíny; 300 mg/l kaseinhydrolyzát; 1,0 mg/l kinetin; 0,7% agar, 4% sacharosa	<i>Kantartzi a kol. (2009)</i>
embrya / vrba košíkářská × topol (<i>Salix viminalis</i> × <i>Populus sp.</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: ethanol (60 s), chlorová voda (5-8 min), destilovaná voda (1-2 min) ○ <u>Ph</u>: 5,8 ○ <u>Médium</u>: MS + ½ koncentrace mikroelementů, 3% sacharosa, 7g/l agar	<i>Zenktelea a kol. (2005)</i>

Typ explantátu / genotyp	Postup	Reference
vajíčka/ kaktusovité (<i>Cactaceae</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: ethanol (2x 1 min; 70%), chlorid vápenatý (10 min; 1,5%), destilovaná voda (3x) ○ <u>Médium</u>: MS + 0,5 mg/ l: 0,5 mg/l 2,4-D; TDZ; 0,09M; 0,18M a 0,26 M sacharosa; 0,25% gelrit	<i>Garcia a kol. (2009)</i>
vajíčka/ hybridi hortenzie (<i>Hydrangea sp.</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlorid sodný (15min + kapka Tweenu), destilovaná voda (3x) ○ <u>Médium</u>: ½ MS + 20g/l sacharosa, 2g/l gellan guma	<i>Kudo a kol. (2008)</i>
vajíčka/ hybridi abélie (<i>Abelia sp.</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: ethanol (1min; 70%), chlorid sodný + Tween (20min; 20%), destilovaná voda (3x) ○ <u>Ph</u>: 5,5 – 5,6 ○ <u>Médium</u>: WPM nebo LS + MS vitamíny (0 µM; 9,8 µM; 3,92 µM 2iP); 50 ml/l kokosové mléko; 3% sacharosa; 0,8% agar	<i>Scheiber a kol. (2003)</i>
prašníky/ zederach indický (<i>Azadirachta indica</i>)	○ <u>Sterilizace</u>: chlorid rtuťnatý (7 min; 0,1%), destilovaná voda (3x) ○ <u>Ph</u>: 5,8 ○ <u>Médium</u>: MS + 1 µM NAA; 5 µM BAP; 1 µM 2, 4-D; 9% sacharosa	<i>Chaturvedi a kol. (2003)</i>

Příloha 2: Fotodokumentace rostlinného materiálu

Obrázek 3: Semeníky *Salix hastata* (Olympus SP 350)



Obrázek 4: Semeník *Salix herbacea* (Olympus SP 350)



Obrázek 5: Semeníky *Salix lapponum* (Olympus SP 350)



Obrázek 6: Semeník s vajíčky *Salix hastata* (Olympus SP 350)



Obrázek 7: Semeník s vajíčky *Salix herbacea* (Olympus SP 350)



Obrázek 8: Semeník s vajíčky *Salix lapponum* (Olympus SP 350)



Obrázek 9: Samičí jehněda *Salix hastata* (Canon PowerShot A480)



Obrázek 10: Samičí jehněda *Salix herbacea* (Canon PowerShot A480)



Obrázek 11: Samičí jehněda *Salix lapponum* (Canon PowerShot A480)



Obrázek 12: Kalus *Salix caprea* (Olympus SP 350)



Obrázek 13: Kalus *Salix viminalis* (Olympus SP 350)



8. Přehled použitých zdrojů a literatury

- Agrawal, D. C., Gebhardt, K. (1994): Rapid micropropagation of hybrid willow (*Salix*) established by ovary culture. *J. Plant Physiol.* 143 (6): 763-765.
- Calagari, M., Mofidabadi, A. J., Tabari, M., Hosseini. (2004): Intraspecific Hybridization of *Populus euphratica* Oliv. Using *in vitro* Technique. *S. M. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 15(2): 109-112.
- Cronquist A. (1988): The evolution and systematics of flowering plants. Ed. 2. - New York.
- Erdelská, Olga (1981): Embryologia krytosemenných rostlín, Veda, Bratislava.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968): Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Exp. Cell Res.*, vol. 50, pp. 151–158.
- Garcia, R. B., Cisneros, A., Schneider, B., Tel-Zur, N. (2009): Gynogenesis in the vine cacti *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Cell Rep.* 28:719–726.
- Guha, S., and Maheswari, S. C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497
- Chalupa, Vladimír (2003): In vitro rozmnožování lípy velkolisté (*Tilia platyphyllos Scop.*) organogenezí a somatickou embryogenezí. *Journal of forest science*, 49, 2003 (12): 537–543.
- Chase M. W., Zmarzty S., Lledó M. D., Wurdack K. J., Swensen S. M. & Fay M. F.(2002): When it doubt, put it in *Flacourtiaceae*: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. – *Kew Bulletin* 57: 141-181.
- Chaturvedi, R., Razdan, M. K., Bhojwani, S. S. (2003): Production of haploids of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by anther culture. *Plant Cell Rep.* 21:531–537.

- Chmelař, J., Koblížek, J. (1990): 65. *Salicaceae* Mirbel – vrbovité, In: Hejný, S., Slavík, B. (eds), Květena České republiky 2, Academia, Praha, pp. 458-495.
- Chu, C. C. (1978): The N6 Medium and Its Applications to Anther Culture of Cereal Crops, Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Beijing: Science, pp. 43–50.
- Kalina, T. (1994): Systém a vývoj sinic a řas, Vyd. 1., Karolinum, Praha.
- Kamenická, A., Rypák, M. (1989): Explantáty v rozmnožování dřevin, Acta Dendrologica, Veda, Bratislava.
- Kantartzi, S. K., Demetrios, G. R. (2009): In vitro gynogenesis in cotton (*Gossypium sp.*). Plant Cell Tiss Organ Cult . 96:53–57.
- Keller, W. A, Rajhathy, T., Lacapra, J. (1975): In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 17 (4): 655 – 665.
- Koblížek, J., Maděra, P., Tichá, S., Úředníček, L. (2009): Dřeviny České republiky, Vyd. 2., Lesnická práce, s.r.o., Brno.
- Kováč, Jaroslav (1995): Explantátové kultury rostlin, 1. přepracované vydání, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J., jun., Kaplan Z., Kirschner J. a Štěpánek J. [eds]. (2002) : Klíč ke květeně České republiky, Academia, Praha.
- Kudo, N., Matsui, T., Okada, T. (2008): A novel interspecific hybrid plant between *Hydrangea scandens* ssp. *chinensis* and *H. macrophylla* via ovule culture. Plant Biotechnology. 25, 529–533.

- Landa, Z. (1973): Současný stav a výhledy kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Landa, Z., Kocourek, F. (1973): Indukce haploidů v prašnických a pylových kulturách in vitro, In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Linsmaier, E. M. et Skoog, F., 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Lloyd, G. and McCown, B. (1981): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421–427.
- Matsuda, K., Kikuta, Y., Okazawa, Y. A. (1981): Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension cultur. *J Fac Agr Hokkaido Univ* 60: 183-193.
- Mikula, Alois (1976): Naše stromy a keře, Vyd. 1., Mladá fronta, Praha.
- Mofidabadi, A. J., Modir-Rahmati, A. R., Tavesoli, A. (1998): Application of Ovary and Ovule Culture in *Populus alba* L. x *P. euphratica* OLIV. Hybridization. *Silvae Genetica* 47, 5–6.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 474–497.
- Novák, František J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia, Praha.

- Opatrný, Z. (1973): Androgeneze in vitro v prašниковých kulturách chlorofylových mutantů *Nicotiana tabacum* L., In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chetrit, P., Remy, R., Rousselle, P., Renard, M. (1983): Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Genet.* 191, 244-250.
- Petrů, E., Řetovský, R. (1956): Rostlinné explantáty, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Popielarska, M. (2005): In vitro pollination of isolated ovule of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 47/1: 85–92.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol. (1998): Fyziologie rostlin, Academia, Praha.
- Procházka, F. [ed.] (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2002). -Příroda, Praha, 18:1-166.
- Řetovský, Rudolf. (1953): Růstové stimulatory, Československá akademie věd, Praha.
- Shenk, R. V., Hildebrandt, A. C. (1972): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.*, 50: 199-204.
- Scheiber, S. M., Robacker, C. D. (2003): Interspecific hybridization between *Abelia* × *grandiflora* 'Francis Mason' and *A. schumannii* via ovule culture. *Euphytica*. 132: 1–6.
- Suprunova T. and Shmykova N. (2008): In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. In: Pitrat, M. (ed) *Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*, INRA, Avignon (France), 371-374.

- Šmíd, Miloslav (2002): Průvodce odbornými názvy rostlin, Vyd. 2., Nakladatelství Brázda, Praha.
- Takeshita, M., Kato, M., Tokumasu, S. (1980): Application of ovule culture to the production of intergeneric or interspecific hybrids in *Brassica and Raphanus*, Japan J. Genetics Vol. 55, No. 5: 373-387.
- Thorpe, T. A. (1981): Plant tissue culture : Methods and Application in Agriculture, Department of Biology, Academic Press, Canada.
- Trigiano, R. N., Gray, D. J. (2005): Plant development and biotechnology, Press, Boca Raton, London.
- Vašut, R. J.: (2006): *Salix* L. [online], Dostupné z www: <<http://botany.upol.cz/prezentace/vasut/salix-complet.pdf>>, Olomouc.
- Vyskot, B., Novák, F. J. (1973): Příspěvek ke studiu androgenese in vitro u některých druhů rodu *Nicotiana* L., In: Landa, Z., Novák, F. J., Opatrný, Z. (Eds): Využití kultur rostlinných explantátů in vitro v genetice a šlechtění, I. kolokvium, ÚEB, ČSAV Praha a Olomouc, 1973.
- Weger, Jan: Topoly a vrby k energetickému užití. Biom.cz [online]. 2009-08-10 [cit. 2011-03-09]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/topoly-a-vby-k-energetickemu-uziti>>. ISSN: 1801-2655.
- Wang, J., Huang, L., Man-zhu, B., Guo- feng, L. (2009): Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. loophorum* var. *linearifolium* via ovule culture at early stage. *Euphytica* .167:45–55.
- White, P. R. (1963): "The cultivation of animal and plant cells" pp. 228. Ronald Press. New York.

- Zenkteler, M., Wojciechowicz, M., Bagniewska-Zadworna, A., Zenkteler, E., Jezowski, S. (2005): Intergeneric crossability studies on obtaining hybrids between *Salix viminalis* and four *Populus* species. *Trees*. 19: 638–643.

- Internetové zdroje:

<http://www.jeseniky.net/sluzby/banky/index.php?obl=1&kat=11&sluz=81&pol=2820>

<http://www.ejeseniky.com/turistika/naucne-stezky/velka-kotlina>