

## Obsah

1. Explantátové kultury rostlin - základní principy .....	1
2. Zařízení laboratoře tkáňových kultur .....	4
2.1. Mytí skla .....	7
2.2. Sterilizace .....	7
2.2.1. Sterilizace kultivačních místností a očkovacích zařízení .....	8
2.2.2. Sterilizace nástrojů a skla .....	8
2.2.3. Autoklávování .....	9
2.2.4. Sterilizace živných roztoků .....	9
2.2.5. Sterilizace rostlinného materiálu .....	10
2.3. Sterilní práce v očkovacím boxu .....	11
3. Kultivační média pro explantátové kultury .....	12
3.1.1. Makroelementy .....	12
3.1.2. Mikroelementy .....	13
3.1.3. Zdroj uhlíku a energie .....	13
3.1.4. Vitamíny .....	14
3.1.5. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku .....	14
3.1.6. Nedefinované organické složky médií .....	15
3.1.7. Látky používané pro zpevnění média .....	16
3.1.8. Růstové regulátory .....	17
3.2. Příprava živných médií .....	20
3.2.1. Zásobní roztoky .....	21
3.2.1.1. Makroelementy .....	21
3.2.1.2. Mikroelementy .....	21
3.2.1.3. Vitamíny .....	22
3.2.1.4. Růstové regulátory .....	22
3.2.1.5. Uchovávání zásobních roztoků .....	23

3.2.1.6. Sterilizace médií .....	23
3.2.1.7. Používaná kultivační média .....	25
3.2.1.8. Příprava některých kultivačních médií .....	25
4. Explantátové kultury a jejich využití k mikropropagaci rostlin .....	30
4.1. Produkce rostlin z axilárních pupenů .....	33
4.1.1. Metoda kultivace vzrostných vrcholů .....	33
4.1.2. Metoda kultivace jednonodálních segmentů .....	35
4.2. Množení přímou morfogenezí .....	36
4.2.1. Přímá tvorba adventivních pupenů .....	36
4.2.2. Přímá embryogeneze .....	37
4.3. Množení nepřímou organogenezí .....	38
4.4. Množení rostlin nepřímou somatickou embryogenezí .....	40
4.4.1. Umělá semena .....	44
5. Fáze mikropropagace .....	47
5.1. Stádium 0 - výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explantátu .....	47
5.2. Stádium I - Odvození aseptické kultury .....	48
5.3. Stádium II - proliferace explantátové kultury .....	52
5.3.1. Somatická embryogeneze .....	52
5.3.2. Stimulace axilárního větvení .....	53
5.3.3. Tvorba adventivních prýtů .....	53
5.4. Stádium III - zakořeňování in vitro .....	54
5.5. Stádium IV - zakořeňování in vivo a aklimatizace .....	56
6. Buněčné suspenzní kultury .....	59
6.1. Metody kultivace buněčných suspenzí .....	59



6.2. Růst a pasážování suspenzních kultur .....	60
6.3. Měření růstu buněčné suspenze .....	63
7. Kultury rostlinných protoplastů a somatická hybridizace .....	66
7.1. Izolace protoplastů z listů .....	67
7.1.1. Jednostupňová izolace .....	69
7,1,2. Dvoustupňová izolace .....	70
7.2. Izolace protoplastů z kalusové kultury .....	71
7.3. Izolace protoplastů z buněčné suspenze .....	71
7.4. Kultivace a regenerace protoplastů .....	71
7.5. Faktory ovlivňující kultivaci protoplastů .....	72
7.5.1. Hustota protoplastů a jejich vitalita .....	72
7.5.2. Metody kultivace protoplastů .....	73
7.5.3. Média používaná ke kultivaci protoplastů .....	73
7.6. Dělení a růst protoplastů .....	74
7.7. Somatická hybridizace .....	75
8. Ozdravování rostlin .....	78
9. Kryoprezervace rostlinného materiálu a uchovávání genofondu rostlin .....	80
10. Produkce sekundárních metabolitů .....	82
11. Genetická charakteristika tkáňových kultur .....	88
12. Aplikace tkáňových kultur rostlin v zemědělství .....	90

Protokoly laboratorních cvičení z tkáňových kultur rostlin .....	97
<u>Regenerace rostlin z nodálních segmentů</u> / .....	98
Experiment 1 - Mikropropagace hvozdíku ( <i>Dianthus arenarius bohemicus</i> ) .....	98
Experiment 2 - Mikropropagace aktinidie čínské ( <i>Actinidia chinensis</i> ) .....	100
Axilární větvení .....	103
Experiment 3 - Mikropropagace gerbery ( <i>Gerbera sp.</i> ) .....	103
<u>Meristémové kultury</u> .....	105
Experiment 4 - Meristémová kultura jahodníku .....	105
Experiment 5 - Meristémová kultura <i>Gladiolus</i> .....	108
Experiment 6 - Mikropropagace banánovníku ( <i>Musa cavendish</i> ) .....	111
Experiment 7 - Meristémová kultura bramboru .....	113
Tvorba adventivních orgánů .....	116
Experiment 8 - Tvorba adventivních prýtlů v kultuře <i>Saintpaulia ionantha</i> .....	116
Experiment 9 - Mikropropagace lilií tvorbou adventivních cibulek .....	118
Nepřímá organogeneze .....	122
Experiment 10 - Organogeneze v explantátové kultuře tabáku .....	122
Experiment 11 - Organogeneze v kalusové kultuře anturie ( <i>Anthurium sp.</i> ) .....	124
Klíčení in vitro .....	127
Experiment 12 - Klíčení semen <i>Silena</i> <i>armeria</i> v podmínkách in vitro .....	127



Kalusové a suspenzní kultury .....	130
Experiment 13 - Odvození kalusové kultury mrkve .....	130
Experiment 14 - Suspenzní kultura mrkve .....	133
Somatická embryogeneze .....	135
Experiment 15 - Somatická embryogeneze v suspenzní kultuře mrkve .....	135
● Protoplastové kultury .....	137
Experiment 16 - <u>Izolace a kultivace protoplastů z listového mezofylu tabáku</u> .....	137
Experiment 17 - <u>Izolace protoplastů z buněčné suspenze tabáku a regenerace rostlin - dlouhodobá izolace</u> .....	144
Experiment 18 - <u>Izolace protoplastů z buněčné suspenze tabáku - krátkodobá izolace</u> .....	145