

**Množení *in vitro***



**Mikropropagace**

# Definice mikropropagace

- Micropropagation is the true-to-type propagation of a selected genotype using *in vitro* culture techniques.
- Most often Micropropagation is also associated with mass production at a competitive price. [P.C. Debergh and R.H. Zimmerman/Eds./: Technology and Application]
- High yield plant production, grown in a nutrient rich gel under sterile lab conditions.

[R. Fenwick 2004]

## Výhody množení *in vitro*

- malý rozměr řízku
- vysoký množitelský koeficient
- zkrácení množitelského cyklu
- možnost použití netradičních orgánů
- možnost načasování na určitý termín
- dobrý zdravotní stav (ozdravování)

# Typy regeneračních procesů

(Němec 1905)

**restituce** = náhrada odňaté části - meristémy  
(meriklonové množení)

**reprodukce** = regenerace z již existujících základů

**regenerace de novo** = odvozování přes kalus, v něm  
diferenciace adventivních pupenů

viz schéma: Opatrný (1988)

# Apikální stonkový meristém

listová primordia

izolovaný „meristém“



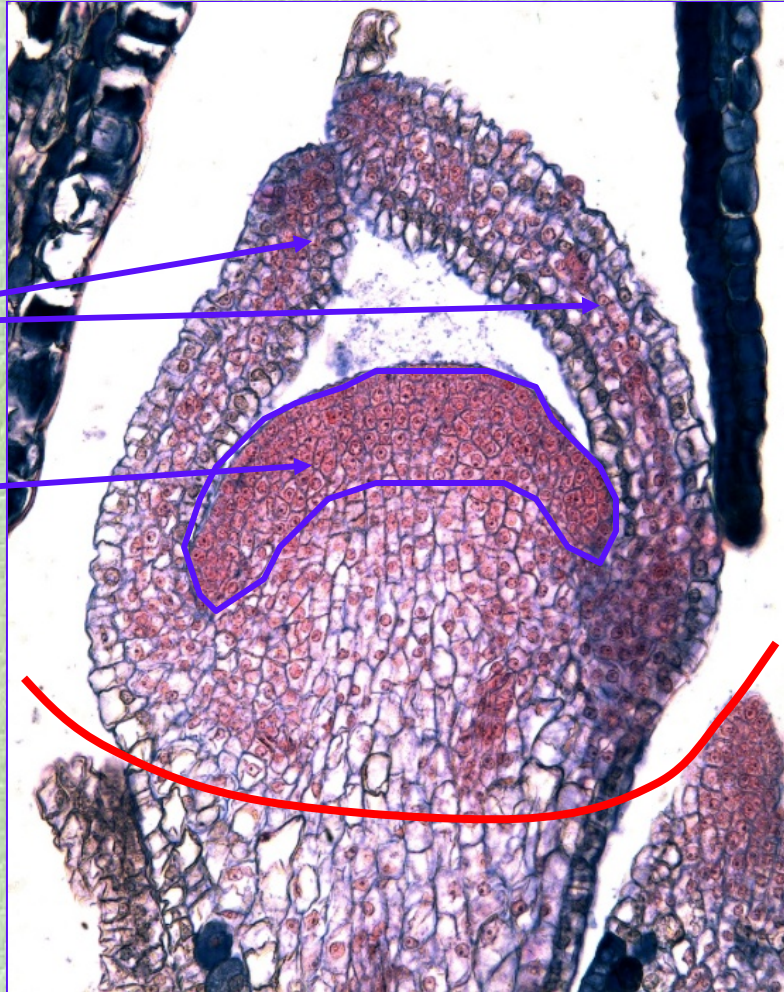
vlastní meristém

# Apex stonku *Begonia rex*

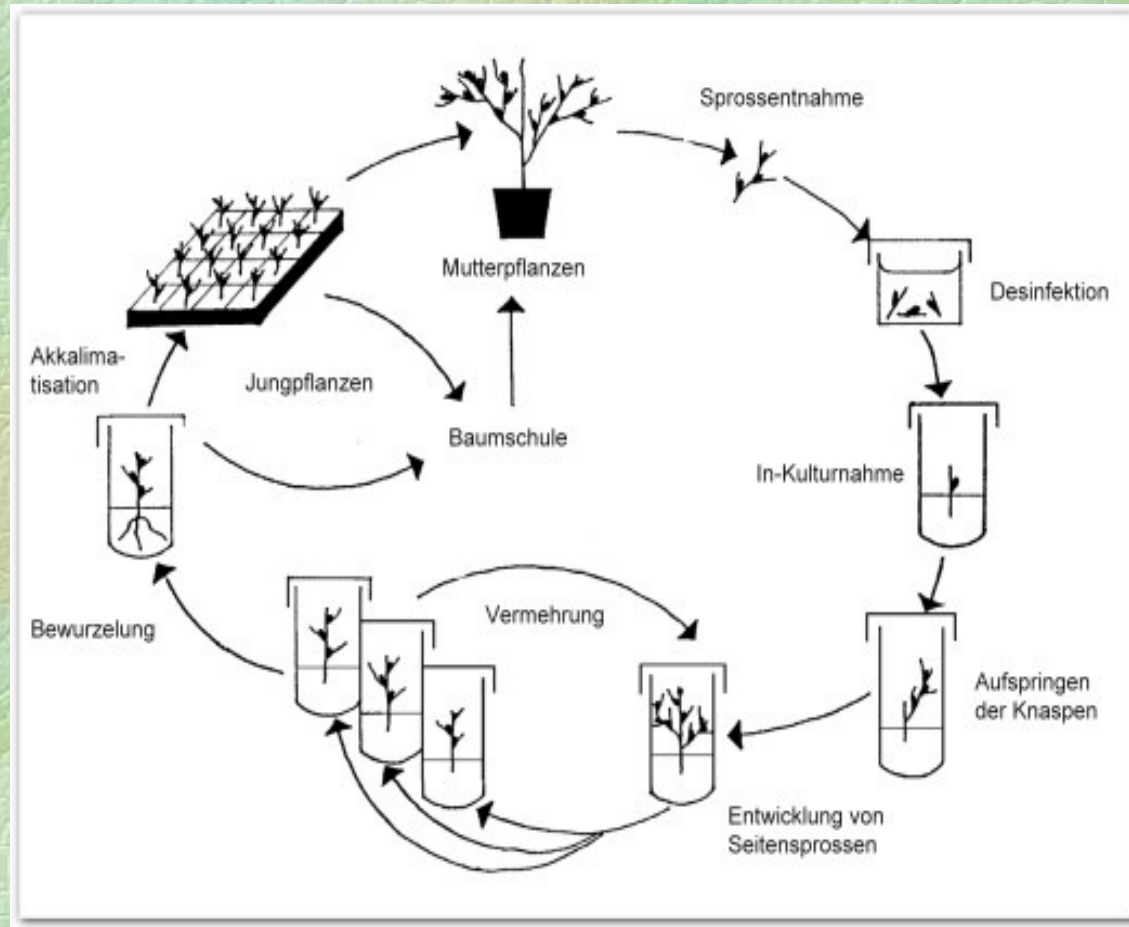
listová primordia

apikální meristém

izolovaný „meristém“



# Reprodukcce



Mikropropagace z axilárních meristémů

# Mikropropagace, klonování rostlin *in vitro*

<http://www.kitchenculturekit.com/africanviolet.htm>

<http://www.jmu.edu/biology/biofac/facfro/cloning/cloning.htm>

<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/microprop.html>

<http://www.micropropagation-services.co.uk/>

okrasné dřeviny - rododendrony

<http://www.janholub.cz>

masožravé rostliny

<http://www.darwiniana.cz> - vydává pro členy časopis Trifid

<http://bestcarnivorousplants.com/dionaea/>

kapradiny

[www.phytotechlab.com/pdf/FernMicropropagation.pdf](http://www.phytotechlab.com/pdf/FernMicropropagation.pdf)



# Stadia mikropropagace *in vitro*

**Murashige (1974)**

**Debergh et Maene (1981)**

0. příprava explantátu - ovlivnění mateřské rostliny

I. iniciace

II. propagace (množení)

II.a elongace (prodlužování) prýtů

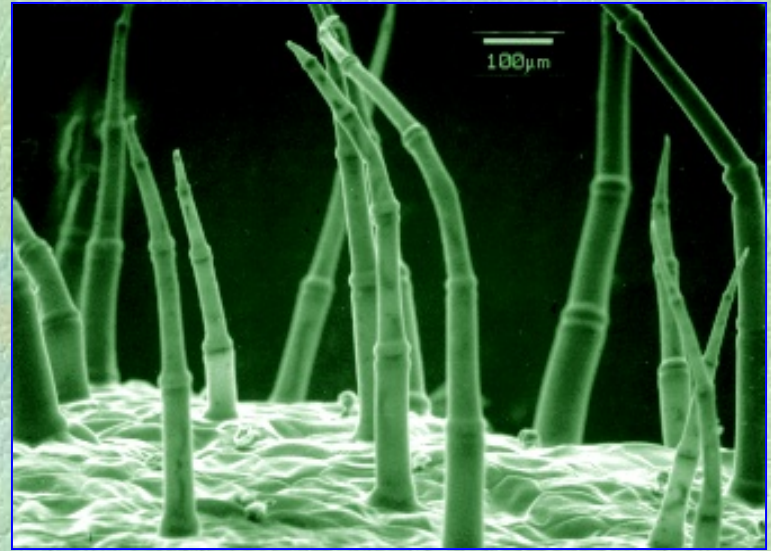
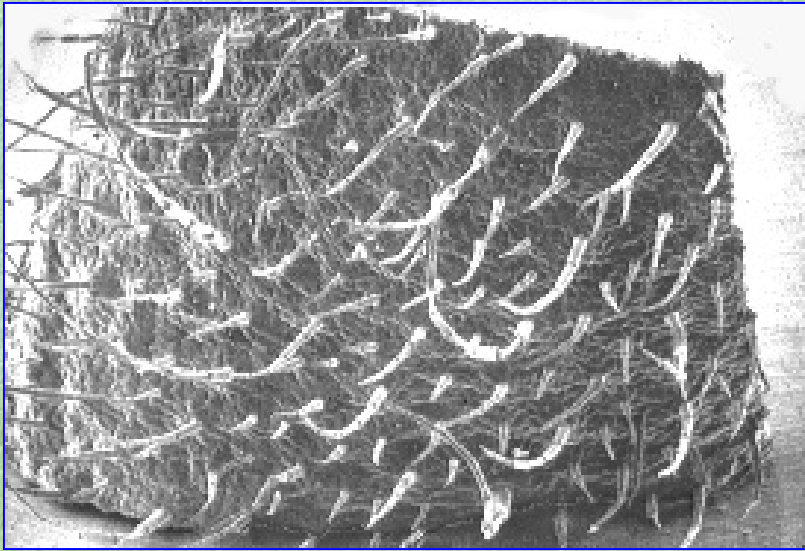
III. zakořeňování

Převádění *ex vitro* do nesterilních podmínek

aklimatizace na nesterilní podmínky (nižší vzdušnou vlhkost, větší kolísání teplot, normální osvětlení)

# Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

I.



II.

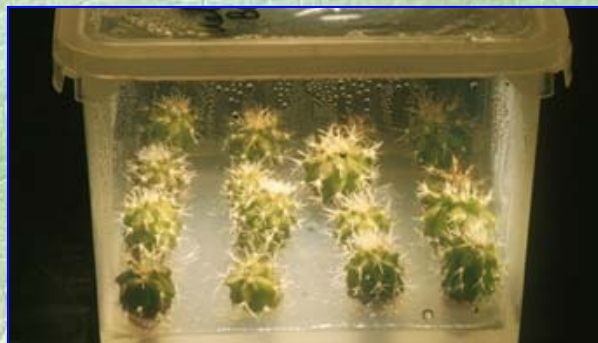


III.



# Mikropropagace

sukulenty



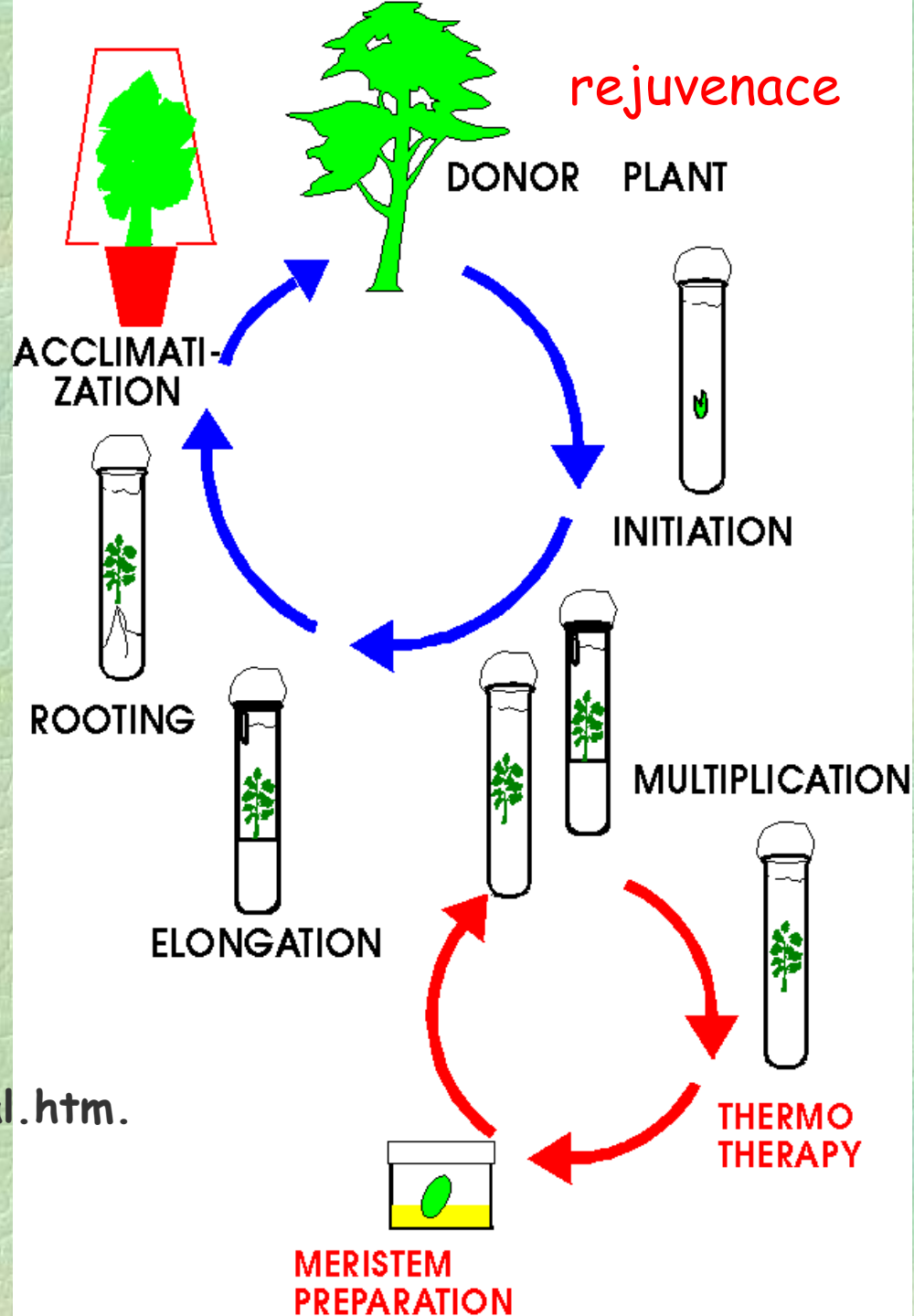
*Drosera capillaris*



*Dionaea muscipula*

masožravé rostliny

# Různé fáze mikropropagace dřevin



[www.boku.ac.at/iam/poster/revital.htm](http://www.boku.ac.at/iam/poster/revital.htm)

# Termoterapie a meristémové kultury



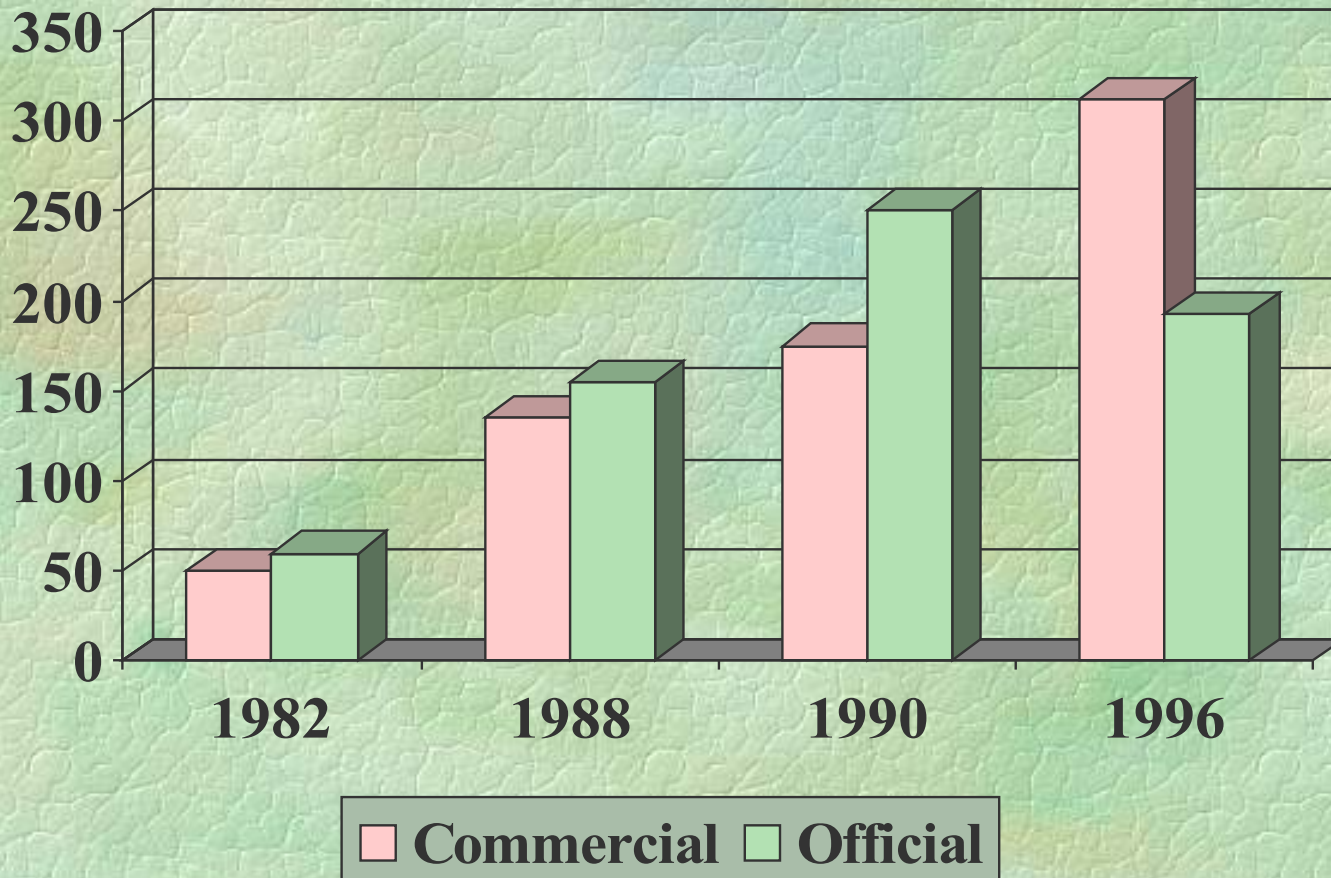
Kombinace *in vitro* termoterapie a meristémové kultury - nejúčinnější metoda eliminace virů. Aktivně rostoucí rostlinný materiál je umístěn do termoterapeutické komory.

Expozice 3 týdny nebo déle, fotoperioda 16 h 38°C, 8 h tma 36°C. Teplota a doba expozice jsou limitovány tolerancí rostliny (závisí na druhu a varietě).

# The European Plant Tissue Culture Industry

## COST meeting 1992, COST 822

Numbers of laboratories



# The European Plant Tissue Culture Industry

## COST 87, COST 822

Country	Official		Commercial	
	1992	1996	1992	1996
Austria	6	5	0	1
Belgium	22	22	11	14
Denmark	6	8	6	8
Czech Rep.	18	18	2	3
Finland	21	13	6	8
France	33	18	0	12
Germany	28	40	25	31
Netherlands	19	9	35	36
Poland		24		7
Slovakia	9	7	3	4
Sweden	3	3	4	3
U.K.	36	31	7	18

# Rostlinné taxony v komerčních laboratořích

COST meeting 1992, Dijon

Rod	Počet laboratoří
<i>Prunus</i>	107
<i>Ficus</i>	82
<i>Philodendron</i>	56
<i>Spathiphyllum</i>	46
<i>Nephrolepis</i>	44
<i>Rosa</i>	41
<i>Syngonium</i>	37
<i>Malus</i>	35
<i>Orchidaceae</i>	31
<i>Solanum</i>	30
<i>Gerbera, Begonia, Fragaria</i>	26



# Celkový počet rostlin produkovaných v komerčních laboratořích v Evropě (x1000)

COST meeting 1992, Dijon

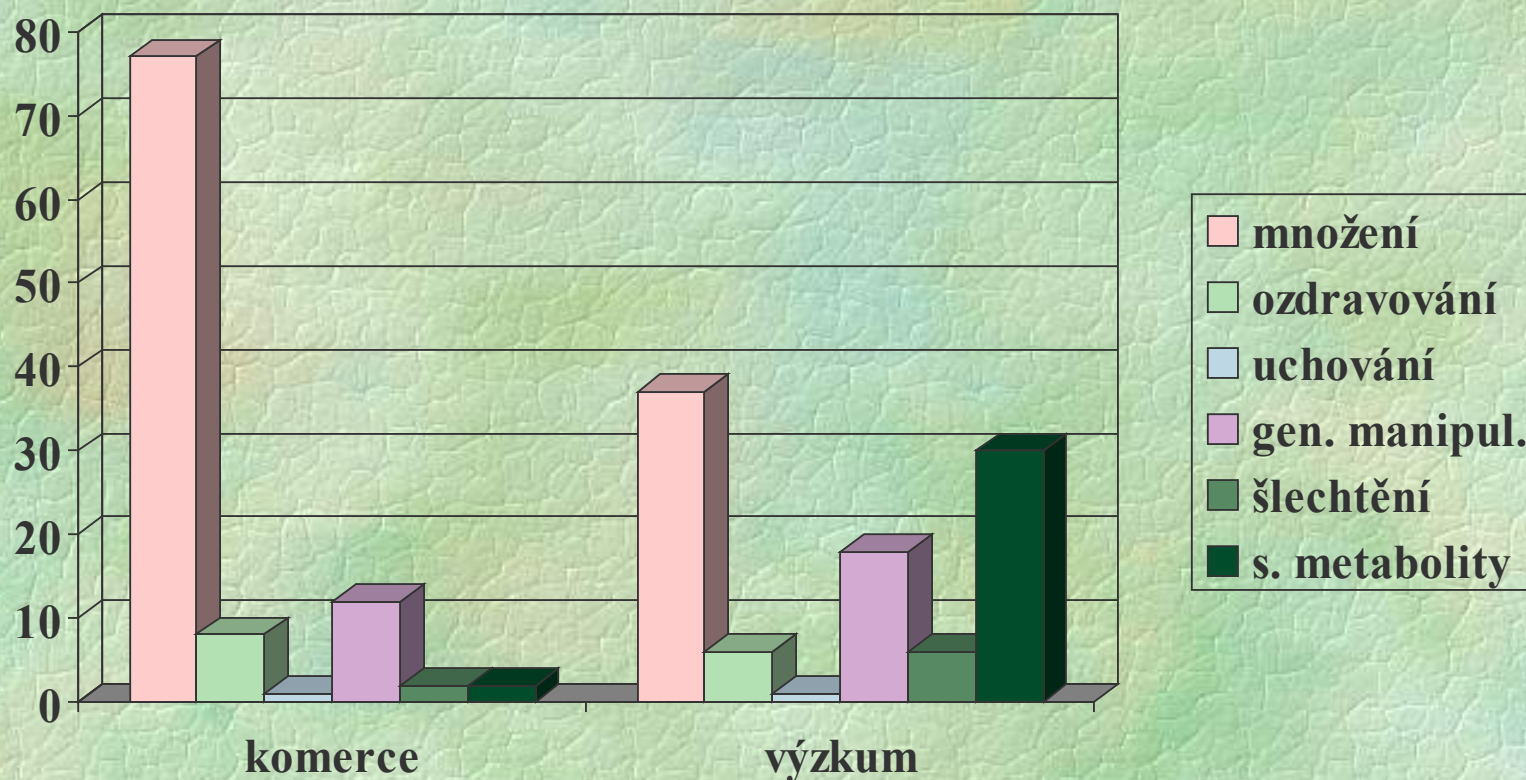
<i>Gerbera</i>	18 383	<i>Solanum tuber.</i>	2 817
<i>Nephrolepis</i>	14 517	<i>Orchidaceae</i>	2 162
<i>Prunus</i>	10 725	<i>Citrus</i>	2 061
<i>Spathiphyllum</i>	9 827	<i>Actinidia</i>	1 112
<i>Lilium</i>	7 112	<i>Betula</i>	842
<i>Fragaria</i>	7 040	<i>Nicotiana</i>	704
<i>Ficus</i>	7 002	<i>Platyserium</i>	700
<i>Saintpaulia</i>	5 696	<i>Diffenbachia</i>	82

# Rostlinné taxony ve výzkum. laboratořích

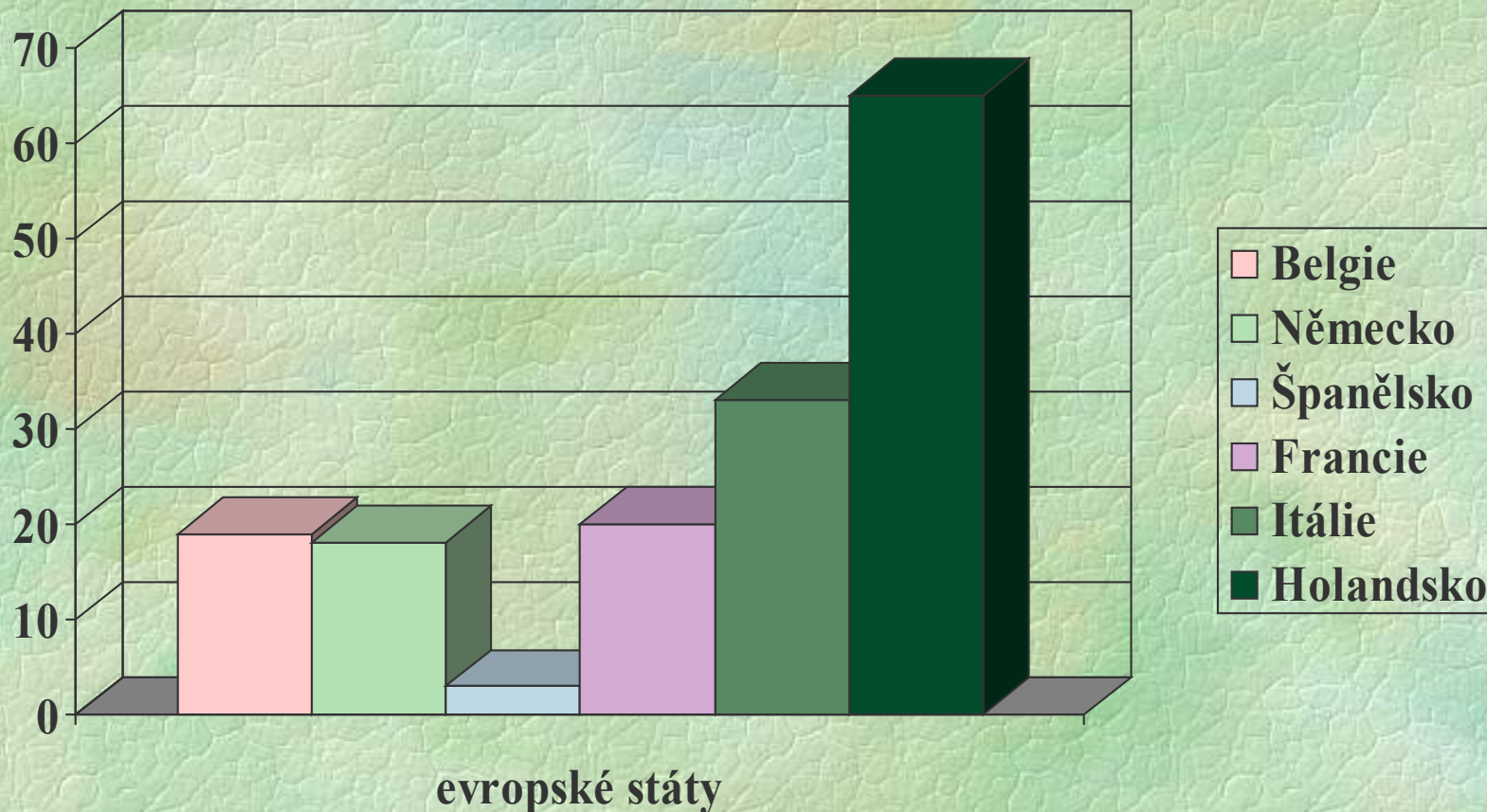
## COST meeting 1992, Dijon

Rod	Počet laboratoří
<i>Prunus</i>	78
<i>Solanum</i>	66
<i>Malus</i>	62
<i>Vitis</i>	42
<i>Brassica</i>	40
<i>Nicotiana</i>	39
<i>Betula</i>	37
<i>Rosa</i>	35
<i>Quercus</i>	32
<i>Fragaria</i>	25
<i>Orchidaceae</i>	13

# Hlavní zájmy evropských laboratoří *in vitro* COST meeting 1992, Dijon



# Produkce rostlin *in vitro* podle zemí (miliony ks.) COST meeting 1992, Dijon



# I. stadium: Iniciace mikropropagace

## 1. výběr materiálu:

zdravotní stav matečných rostlin

ontogenetické stáří (rejuvenilizace)

vliv genotypu

## 2. desinfekce

## 3. výběr typu explantátu

## 4. přítomnost **cytokininu a auxinu** v médiu

## II. Stadium mikropropagace: propagace

médium se **sníženou koncentrací regulátorů**  
nebo bez nich, možný přídavek giberelinů

Opakované rozdělování vzniklých prýtů **není**  
**neomezené**: většinou 10 - 15 pasáží

pak je nutné nové založení kultury

možné problémy:

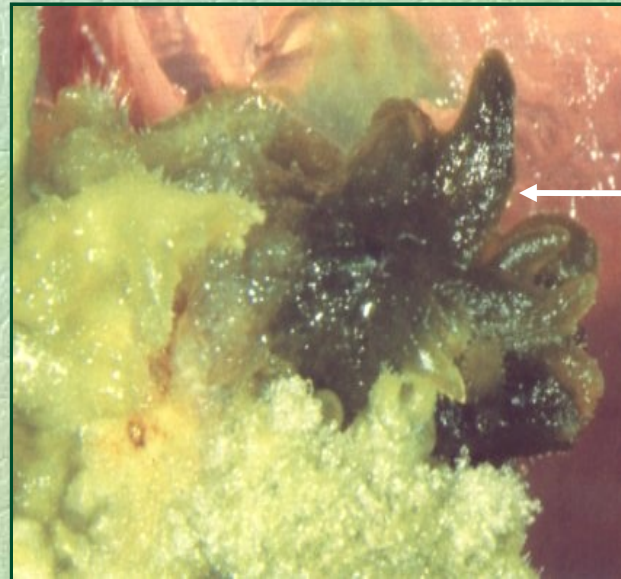
**habituace**

**vitifikace**

## II. stadium mikropropagace




mikropropagace tořivky  
*Streptocarpus*



adventivní  
prýty

mikropropagace melounu  
*Cucumis melo L.*

### III. Stadium mikropropagace: zakořeňování

- snížení koncentrace minerálních solí
- možná **indukce auxinem** (**pulsní** - vysokou koncentrací nebo **dlouhodobější** působení nízkou koncentrací)
- pro tvorbu funkčních kořenů = vhodnější tekuté médium
- absence mykorhizy  inokulace kulturami hub



# Mikropropagace - stadium III. zakořeňování



mikropropagace *Lilium*



mikropropagace  
*Malus*

# Aklimatizace

nedostatečně vyvinutá kutikula (vosky)

nefunkční stomata

kořeny vyvinuté *in vitro* odumírají



Snižování relativní vlhkosti *in vitro* - „bottom cooling“

Zvyšování vlhkosti - tunely nebo mlžení

Zabránění infekci po převodu:

pečlivé odstranění zbytků agaru

desinfekce substrátu - Previcur-N (0,15-0,25%)

# Aklimatizace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

skleněné akvárium



regenerované rostliny



# Aklimatizace

sadbovače s nezakořeněnými  
mikrořízky přeneseny do mlžné  
komory ve skleníku



vyvíječ mlhy

<http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/hort400/raspberry/stageIV.html>

# Příklady kultivarů



# *Streptocarpus* - tořivka



Str-1



Str-2

# Nevýhody množení *in vitro*

- možnost nežádoucího zvětšení variability (tzv. somaklonální variabilita)
- nebezpečí genetické degradace
- protokoly nejsou optimalizované pro všechny druhy
- problémy s vitrifikací a habituací
- pracnost a energetická náročnost - cena

**Habituace** = forma zkušenosti, která vede k vymizení reakce živočicha nebo rostliny na neškodný, dlouho opakovaný podnět nebo skupinu podnětů = snížení odpovědi

# Vitrifikace („hyperhydricity“)

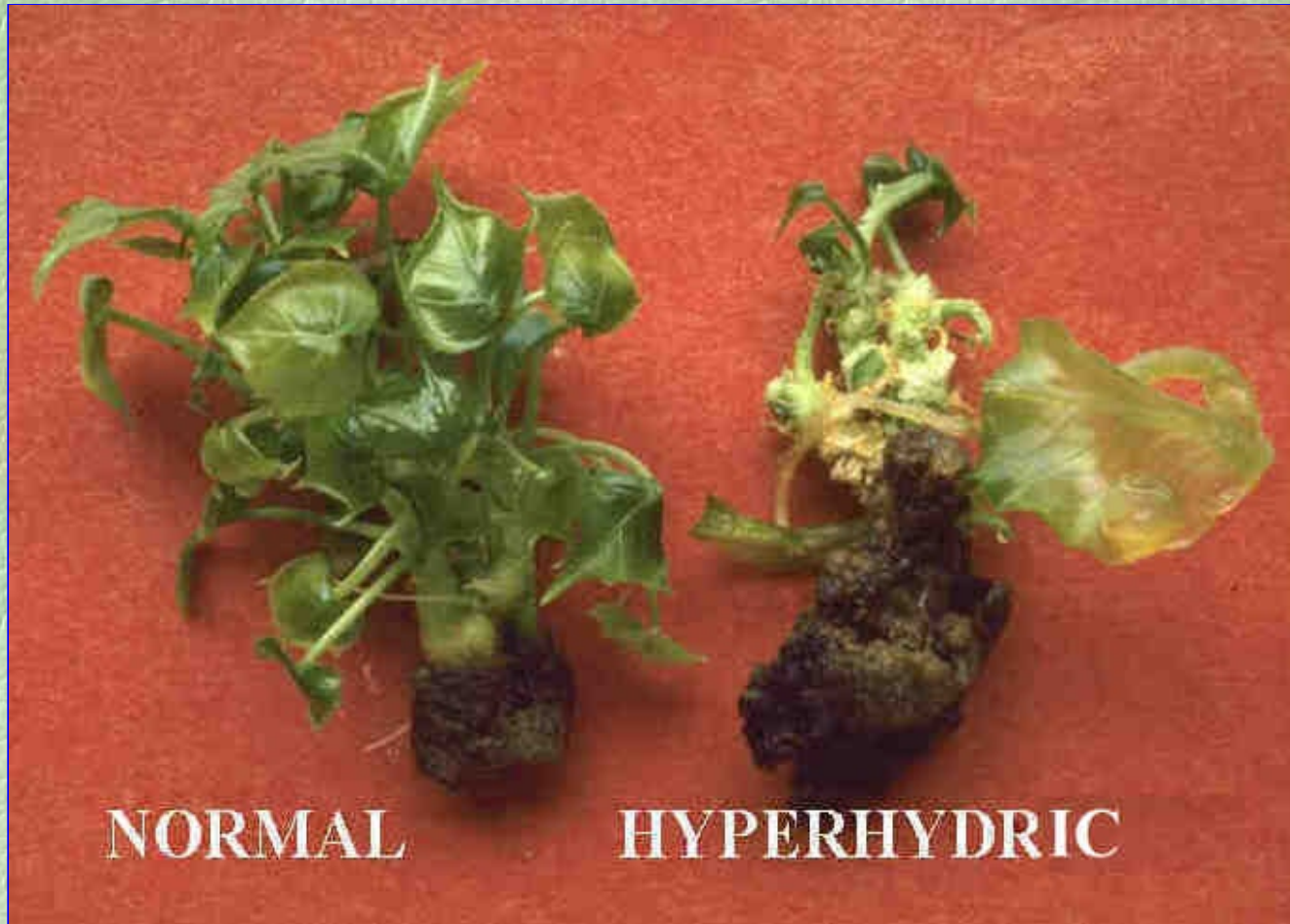
Symptomy vitrifikace nemusí být vždy viditelné pouhým okem. Viditelné příznaky se mohou objevit u citlivějších taxonů nebo v případě nepříznivějších podmínek.

## Příklady nepříznivých podmínek:

- příliš vysoká koncentrace cytokininu
- vysoká kapacita retence vody
- příliš těsně uzavřené kultivační nádoby
- příliš nízká koncentrace gelujících látek (agar)



Příklad jasných vizuálních symptomů vitrifikace  
u *Oreopanax nymphaefolia*



# Znaky vitrifikace



## morfologické

1. kratší internodia
2. tvorba růžic
3. průhledné, křehké, zkroucené listy
4. abnormální barva
5. slepené jehlice u konifer

## anatomické

1. velké interceluláry
2. hypolignifikace
3. redukovaný vývoj cévního systému
4. defektní epidermis
5. změněné ukládání vosků
6. snížená funkce průduchů

## biochemické

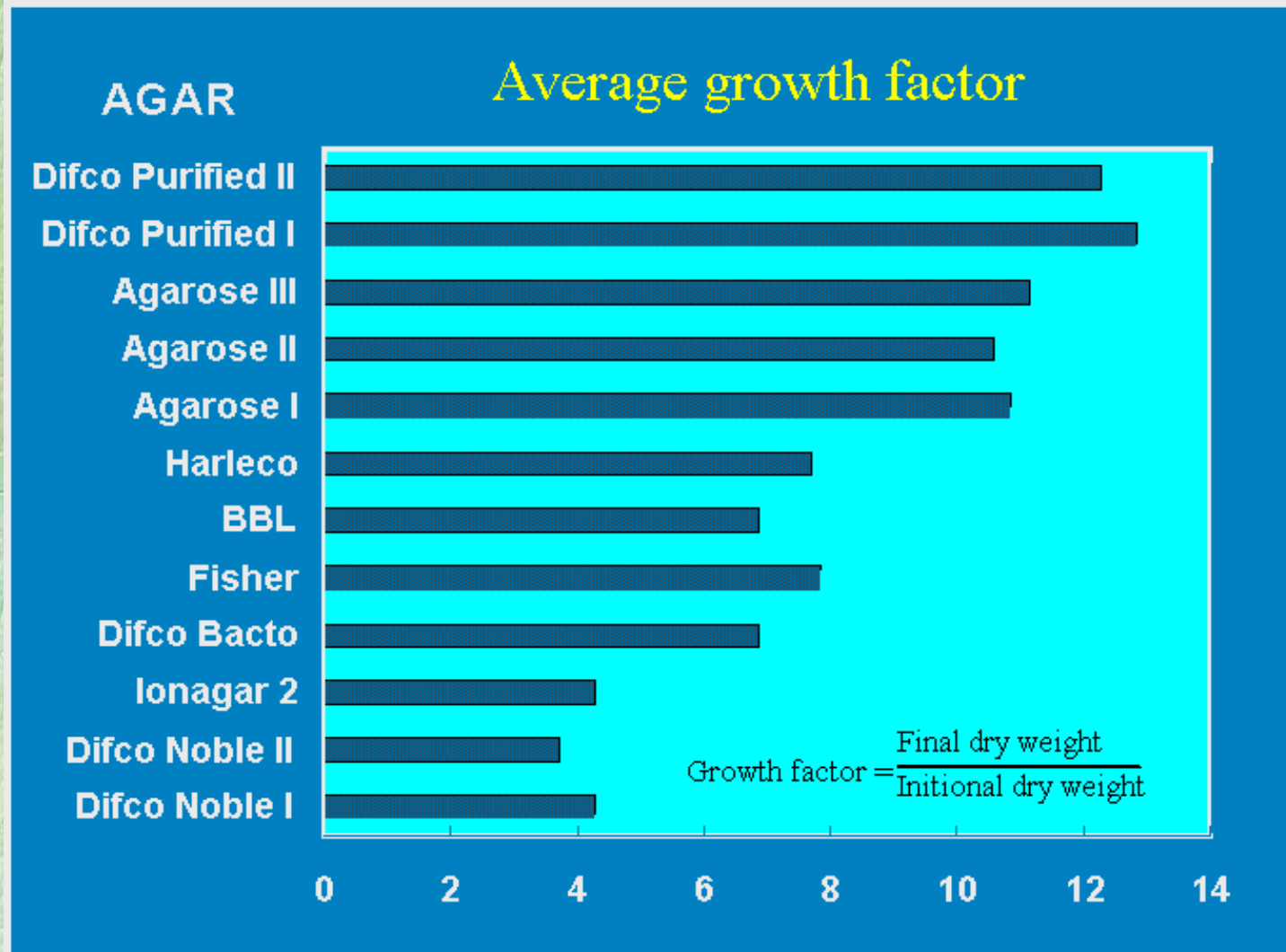
žádné  
obecné  
závěry

# Srovnání atmosféry ve skleníku a kultivační nádobě

složka	skleník	kultivační nádobá
$O_2$	22 %	až 4 %
$N_2$	77 %	až 87 %
$CO_2$	365 - 1000 ppm	až 20 %
vodní pára	60-85 %	± 100 %
etylén	5 ppb - 100 ppb	větší než 2 ppm

# Vliv různých druhů agaru na růst apikálních prýtů *Picea abies*

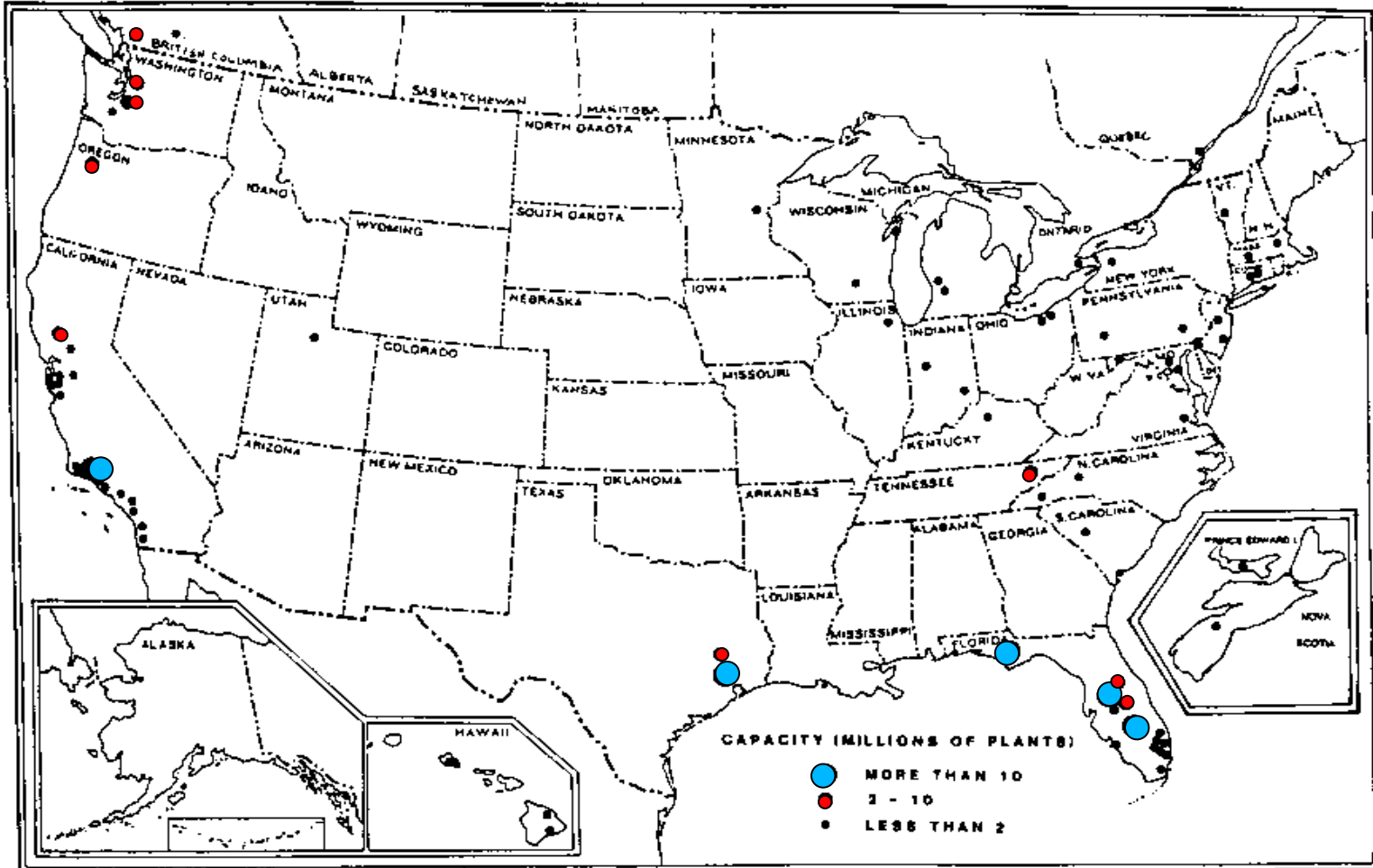
(koncentrace agaru 1%) (Romberger and Tabor, 1971)



# komerční laboratoře



# Komerční laboratoře v USA

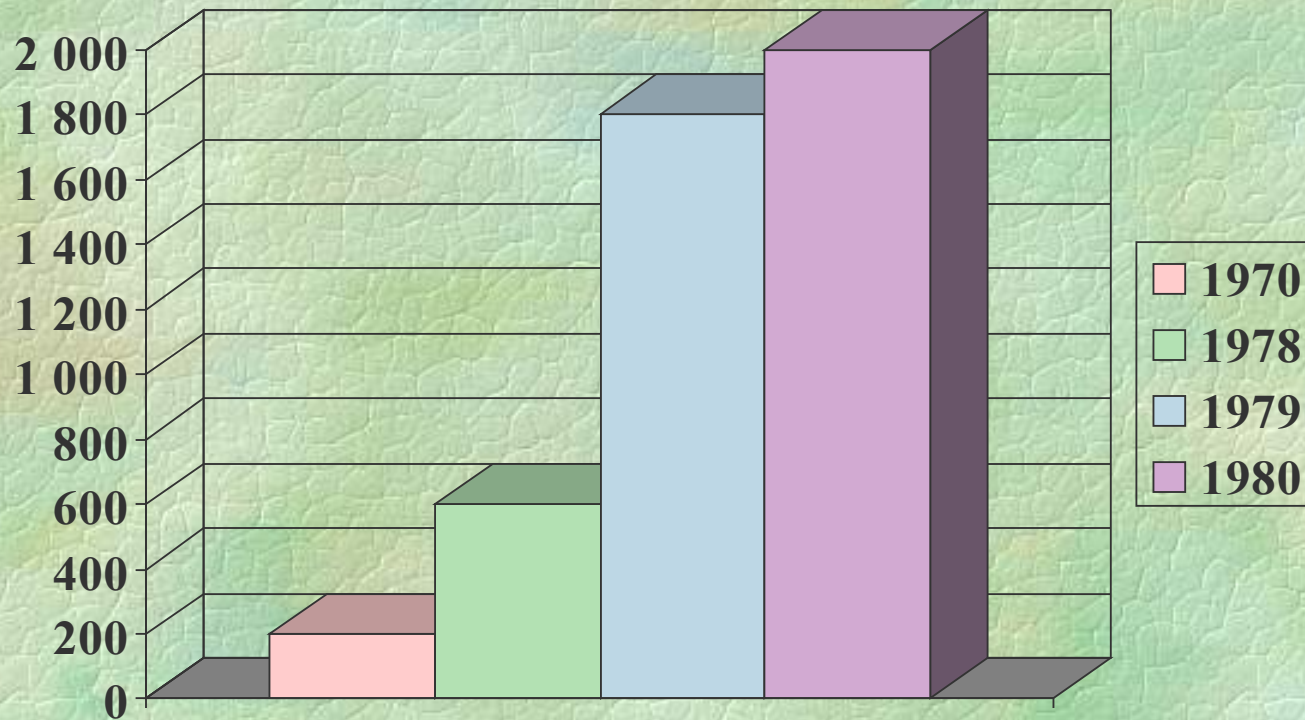


# Komerční laboratoře ve vybraných zemích Asie (1988)

Země	Počet laboratoří	Produkce (v mil.)
Bhútán	1	0,1 - 0,2
Indie	4	4 - 5
Indonésie	8	3 - 6
Japonsko	30	10
Korea	10	3
Malajsie	8	6 - 8
Nepál	1	0,1 - 0,5
Filipíny	2	0,5 - 1,0
Singapur	4	3 - 4
Srí Lanka	1	2 - 4
Thajsko	18	35
<b>Celkem</b>	<b>105</b>	<b>65 - 86</b>

# Produkcje sazenic *in vitro* (x 1000)

## Firma Miyoshi (Japonsko)





# Hlavní skupiny rostlin produkované *in vitro* v Asii (1987 - 88)

Druh	Počet v mil.	%	Prognóza
Ozdobné listem	7	9	mírný nárůst
Orchideje	44	60	stagnace
Tropické květy	0	0	mírný nárůst
Květy mírného pásma	13	17	mírný nárůst
Ovoce	5	8	výrazný nárůst
Koření	1	1	mírný nárůst
Plodiny plantáží	4	5	mírný nárůst
Lesnictví	0	0	střední nárůst
<b>Celkem</b>	<b>74</b>	<b>100</b>	

# Komerční laboratoře - Evropa



# Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

## Hrnkové rostliny (92,3)

1. Nizozemí (26,7)
2. Francie (22,6)
3. Belgie (16,6)



*Alocasia sanderiana* var. *nobilis* pochází z Filipín, kde je údajně vyhubená nebo velmi vzácná

## Řezané květy (37,8)

1. Nizozemí (18,2)
2. Francie (10,1)
3. Itálie (4,9)



*Malus*

## Ovocné stromy (19,4)

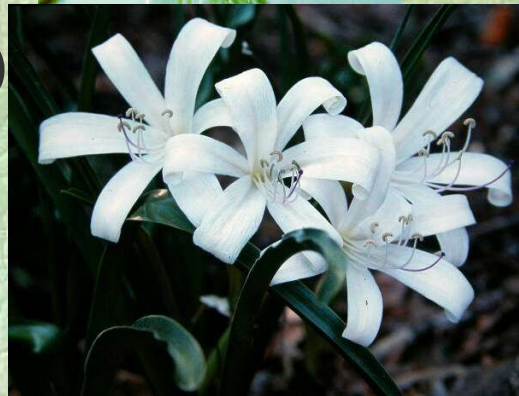
1. Itálie (14,6)
2. Španělsko (1,9)
3. Francie (1,7)



*Calathea*

## Okrasné cibuloviny (13,2)

1. Nizozemí (13,0)
2. Itálie (0,2)
3. Finsko (0,01)



*Crinum lugardiae*

# Klonální množení rostlin - řezané květy



Agro Brno - Tuřany  
licenční množení gerber (*Gerbera jamesonii*)

# Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

- **Drobné ovoce (9,4)**
  1. Německo (3,4)
  2. Finsko (1,2)
  3. Francie (1,0)
- **Orchideje (5,3)**
  1. Nizozemí (2,4)
  2. Německo (1,9)
  3. Francie (0,5)
- **Ozdobné keře (3,9)**
  1. Belgie (2,6)
  2. Německo (0,4)
  3. Francie (0,3)



<http://www.janholub.cz/my.html>



**Rododendrony**  
Azalky  
Hosta  
Kalmia



# Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

## Zahradní trvalky (3,0)

1. Francie (2,2)
2. Belgie (0,5)
3. Nizozemí (0,1)

## Zemědělské plodiny (2,4)

1. Belgie (0,5)
2. Nizozemí (0,4)
3. Španělsko (0,4)

## Zelenina (1,4)

1. Itálie (0,7)
2. Francie (0,5)
3. Nizozemí (0,1)

## Lesnictví (1,3)

1. Francie (0,6)
2. Finsko (0,5)
3. Německo (0,2)



*Echinacea purpurea*  
'Lilliput' PPAF PVR



*Hosta 'Lacy Belle'*



mikropropagovaná  
břıza

# Statistika FloraCulture Int.2004 (mil.EUR)

Celkové tržby za **prodané okrasné rostliny** dosáhly  
v Evropě **9 996 milionů EURO**

Holandsko	3 542	Rakousko	240
Itálie	1 826	Polsko	186
Německo	1 174	Maďarsko	95
Španělsko	345	Česko	43

USA a Kanada	5 861
Japonsko	3 147
Jižní Amerika	1 180
Korea	568
Austrálie	335



# Statistika FloraCulture Int.2004

- prodej množitelského materiálu: + 5%
- jednoleté okrasné 56,2%
- pereny +17,3%
- hrnkové +12,5%
- řezané květiny + 1,8%
- řezaná zeleň +0,02%



# Dutch Wholesale Board Statistika 2004

Holandský export okrasných rostlin do nových zemí EU se zvýšil o 8%; maďarský export o 19,4% a polský o 10%.

**Česká republika** je

- cílovou zemí pro polské **hrnkové rostliny** a sadbu jednoletých okrasných rostlin;
- **řezané květiny** přes holandské obchodní firmy dováženy z Kolumbie, Equadoru, Itálie a Holandska.