

**Vedecká rada Fakulty záhradníctva a krajinného inžinierstva
Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre**

Ing. Oľga Mičudová

Autoreferát dizertačnej práce

**TECHNIKY VEGETATÍVNEHO ROZMNOŽOVANIA
HABITUÁLNE VÝNIMOČNÝCH JEDINCOV
*Punica granatum L.***

Na získanie vedecko – akademickej hodnosti *philosophiae doctor*
vo vednom odbore doktorandského štúdia: 41-42-9 Záhradníctvo

Nitra, 2007

Dizertačná práca bola vypracovaná v internej forme doktorandského štúdia na Katedre ovocinárstva, vinohradníctva a vinárstva, FZKI SPU v Nitre.

Predkladateľ: **Ing. Oľga Mičudová**

Katedra ovocinárstva, vinohradníctva a vinárstva FZKI
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Školiteľ: **prof. Ing. Ján Matuškovič, PhD.**

Katedra ovocinárstva, vinohradníctva a vinárstva FZKI
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: **Ing. Daniela Benediková, PhD.**

Génová banka, Piešťany
Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany

prof. Ing. Anna Jakábová, CSc.

Katedra biotechniky parkových a krajinných úprav FZKI
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.

Zahradnická fakulta MZLU Brno, Lednice na Moravě

Autoreferát bol rozoslaný dňa:

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa o hod.
pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 41-42-9 Záhradníctvo
na Fakulte záhradníctva a krajinného inžinierstva SPU v Nitre vymenovanou predsedom
spoločnej odborovej komisie dňa

Miesto konania: Katedra ovocinárstva, vinohradníctva a vinárstva
FZKI SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

prof. Ing. Ivan Hričovský, Dr.Sc.
predseda spoločnej odborovej komisie
FZKI SPU Nitra

ABSTRAKT

Pestovanie subtropických okrasných i ovocných druhov v pestovateľských podmienkach Slovenska nie je jednoduché a vyžaduje si neustále prehĺbovanie praktických a odborných vedomostí, a to predovšetkým z pohľadu rozmnožovania, čím možno prispieť nielen k rozširovaniu sortimentu netradičného ovocia u nás, ale popri dekoratívnej funkcii dreviny aj k spestreniu výživy človeka.

V dizertačnej práci je obsiahnutá problematika vegetatívneho rozmnožovania jedincov *Punica granatum* L., ktorých habitus bol ovplyvnený chemomutagénom azidom sodným, so zameraním na voľbu optimálnych exogénnych faktorov (teplota a vlhkosť vzduchu), stimulátorov rastu a termínu odberu odrezkov v procese ich zakoreňovania a minimalizovania ich mortality. Rozmnožovanie spôsobom *in vitro* bolo zamerané na vytýčenie vhodného variantu materskej rastliny za účelom znižovania úhynu explantátov a intenzívnej tvorby listov, výhonkov, korieňkov a kalusu.

Zmeny v habituse rastlín možno využiť pri okrasnom pestovaní v tvare bonsaj.

Kľúčové slová: *Punica granatum* L., vegetatívne rozmnožovanie, odrezky, azid sodný, *in vitro*, dekoratívna rastlina

ABSTRACT

Growing of subtropical decorative and fruit species in cultivate conditions of Slovakia is not easy and it requires a lot of practical and scientific knowledges, which should be deepen, mainly from the propagation point of view, it may be useful not only to expansion of nontraditional fruit – assortment in our country, but beside decorative function of wood species to food humen diversify, too.

My dissertation thesis incorporates theme of vegetative propagation from mother plants *Punica granatum* L. influenced by chemical mutagen natrium azide. The thesis is aimed at selection of optimal exogenous factors (air temperature and humidity), growth stimulators and terms of taking cuttings in rooting process and to minimize their fatality. Propagation by way *in vitro* was aimed to set up an appropriate variant of mother plant in order to reduce fatality of segments and intensive leave, shoot, root and callus formation.

Habit changes should be useful for decorative growing in bonsai form.

Key words: *Punica granatum* L., vegetative propagation, cuttings, natrium azide, *in vitro*, decorative plant

OBSAH

ABSTRAKT	3
1. ÚVOD	5
2. CIEĽ PRÁCE	5
3. LITERÁRNY PREHĽAD	6
3.1 História pestovania <i>Punica granatum</i> L.	6
3.2 Botanická charakteristika <i>Punica granatum</i> L.	6
3.3 Spôsoby rozmnožovania <i>Punica granatum</i> L.	7
3.4 Význam pestovania <i>Punica granatum</i> L.	7
4. MATERIÁL A METÓDY	8
4.1 Charakteristika biologického materiálu	8
4.1.1 Charakteristika použitého chemomutagénu azid sodný NaN_3 a jeho prejavu v habituse rastlín <i>Punica granatum</i> L.	8
4.2 Charakteristika pokusného miesta	9
4.3 Aplikované metódy	9
4.3.1 Vegetatívne rozmnožovanie odrezkami	9
4.3.2 Vegetatívne rozmnožovanie v podmienkach <i>in vitro</i>	10
4.4 Metódy a spôsoby hodnotenia	12
5. VÝSLEDKY	13
5.1 Zhodnotenie vegetatívneho spôsobu rozmnožovania <i>Punica granatum</i> L. odrezkami	13
5.2 Zhodnotenie vegetatívneho spôsobu rozmnožovania <i>Punica granatum</i> L. metódou <i>in vitro</i>	15
6. ZÁVERY A ODPORÚČANIA PRE PRAX	16
6.1 Zhodnotenie sledovaných charakteristík pri vegetatívnom spôsobe rozmnožovania odrezkami	16
6.2 Zhodnotenie najvhodnejšieho variantu materských rastlín z hľadiska schopnosti vytvárania púčikov, listov, výhonkov, koreňkov a kalusu a z pohľadu znižovania mortality jedincov	17
6.3 Odporúčania pre prax	17
7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	18
8. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA	19

1. ÚVOD

Ľudská spoločnosť je už od nepamäti spojená s prírodou. Jednou z jej prvotného okruhu záujmu je rozmach záhradníctva, a to nielen v oblasti dosahovania produkcie, ale aj v sfére okrasného záhradníctva. S narastaním ponuky na trhu stúpa aj záujem o menej známe ovocné druhy. Mnohé z týchto zelených poslov trópov a subtrópov sú pestovateľsky veľmi atraktívne, pretože často krát spájajú v sebe krásu s úžitkom. Pestovanie netradičných druhov ovocia cudzieho i domáceho pôvodu si vyžaduje venovať zvláštnu pozornosť pre vysokú nutričnú hodnotu plodov a pre obsah niektorých látok v plodoch. Obohacujú tak druhovú skladbu ovocia, sú využiteľné pre rôzne sféry priemyslu vzhľadom na všestrannú možnosť ich využitia a ich pestovanie umožní znížiť dovoz ovocia zo zahraničia. Zároveň prispievajú k obnove a estetickému vzhľadu krajiny a k tvorbe príjemného životného priestoru a tvoria tak spolu dialektický celok.

Dopestovanie niektorých cudzokrajných ovocných druhov, akým je aj granátovník púnsky (*Punica granatum* L.) v našich podmienkach nie je jednoduché a vyžaduje si to obrovskú námahu, predstavivosť, trpezlivosť a záujem, ale aj odborné a praktické vedomosti. Práve preto je potrebné zhromažďovať nové poznatky z oblasti rozmnožovania a pestovania, zvýšiť tak adaptabilitu rastlín a reprodukčnú schopnosť najmä ohrozených a ojedinelých rastlinných druhov a v konečnom dôsledku tak napomáhať nielen k rozširovaniu druhového sortimentu u nás, ale aj k spestreniu zdravej výživy človeka.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo hodnotenie kvantitatívnych a kvalitatívnych znakov *Punica granatum* L. ovplyvnených fyziologicky aktívnymi látkami v procese vegetatívneho rozmnožovania odrezkami a mikropropagáciou.

Sledoval sa vplyv chemomutagénu NaN_3 s koncentráciami 0,3 mM, 0,5 mM a 0,7 mM na formovanie habitusu rastlín *Punica granatum* L. pestovaných v podmienkach *in vitro*, interakcia rastových látok vo vzťahu k rastu a vývinu explantátov (zdravotný stav explantátov, ich mortalita, tvorba jednotlivých orgánov) a adaptácia regenerantov na zmenené podmienky. Pri rozmnožovaní odrezkami sa vyhodnocovala schopnosť tvorby kalusu a korienkov a ich mortalita.

3. LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 História pestovania *Punica granatum* L.

Granátovník pochádza z Iránu a Prednej Ázie. Na východ rozšírenie granátovníka siaha k severozápadnej Indii a severovýchodnému Afganistanu, na severe k stredoázijským republikám bývalého ZSSR, prechádza okrajom iránskeho pobrežia Kaspického mora a južným cípom Veľkého kaukazského chrbátu na Zakaukazsko. Na západe dosahuje pobrežie Malej Ázie a na juhu pobrežie Aralského jazera (COLOV, 1985). Podľa odhadu ho pestujú v kultúre viac ako päťtisíc rokov, najmä v krajinách okolo Stredozemného mora a je rozšírený takmer do všetkých subtropických oblastí sveta ako úžitková i okrasná rastlina. Je jednou z mála rastlín, ktoré boli oddávna predmetom bájak a povestí. Už v starovekom Grécku bol zasvätený bohyniam Afrodite a Hére ako symbol plodnosti a lásky (HUŠÁK *et al.*, 1996). Granátovník patrí medzi nenáročné dreviny vyskytujúce sa v aridných oblastiach aj v striedavo vlhkom podnebí trópov. Úrodu môže prinášať až trikrát ročne (NOWAK – SCHULZOVÁ, 2002).

3.2 Botanická charakteristika *Punica granatum* L.

Íde prevažne o tropické rastliny drevitého, zriedka aj bylinného charakteru (VOLF *et al.*, 1988). Tento subtropický ovocný druh krovitého alebo nízkeho stromovitého vzrastu s bohatým vetvením dorastá až do výšky 3–5 m, slabšie rastúce formy dosahujú výšku 0,5–0,7 m. **Koreňová sústava** granátovníka je rozložená prevažne plošne (COLOV, 1985). Podľa ŠAMLA (1994) rastú **listy** samostatne alebo sú zoskupené v listovej ružici. Sú drobné (2-8 cm), mäkké, podlhovasté, elipsovité alebo vajcovito kopijovité, na vrchnej strane listu lesklé, tmavozelenej farby a na rube svetlozelené, bez trichómov. **Kvety** sú obojpohlavné a vitálne (so slabšie vyvinutým piestikom), sú veľmi atraktívne, majú hruškovitý tvar, sú veľmi nápadné, mäsité so zvonovitým kalichom (<http://www.unifi.it/project/ueresgen29/ds2.html>, 2006-05-05). **Plod** – granátové jablko - môžeme charakterizovať ako červenú, žltú alebo belavú vysychavú bobuľu guľatého tvaru (VOLF *et al.*, 1988), ktoré je vyplnené hranatými, tesne na seba priliehajúcimi granulami, ktorých počet môže byť až (COLOV, 1985). Vnútro plodu je rozdelené stenami z hubovitého pletiva na viaceré komory, v ktorých ležia početné nepravidelnokružľovité až fazuľovité žltkaste alebo šarlátové, 9 x 3 mm veľké **semená** (NOWAK – SCHULZOVÁ, 2002).

3.3 Spôsoby rozmnožovania *Punica granatum* L.

Granátovník možno množiť vegetatívne - zakorenením odrezkov, odnožami či vrúbľovaním, alebo generatívne - výsevom semien (TRUHLÁŘ, 1987).

Semená sa pred výsevom stratifikujú v čistom a mierne vlhkom piesku. Možno vysievať aj nestratifikované semená, ktoré sa z plodov vyberajú 2 až 3 dni pred marcovým výsevom. Pri prerastených, starých divých alebo polokultúrnych jedincoch sa osvedčilo vrúbľovanie, najmä vrúbľovanie pod kôru alebo anglická kopulácia. Štepiť sa na jar alebo na jeseň očkovaním na spiace očko (COLOV, 1985).

V prípade spôsobu množenia drevitými odrezkami ich odoberáme v druhej polovici augusta. Menej častý je spôsob množenia bylinnými odrezkami, a to najmä vtedy, ak rastliny ťažšie zakoreňujú z drevitých odrezkov. Odber koreňových odrezkov z materských rastlín robíme v jesennom období. Vhodné je použiť stimulatory pre lepší priebeh zakoreňovania (VILKUS *et al.*, 2000).

Rozmnožovaním granátovníka púnskeho v podmienkach *in vitro* z listových explantátov sa zaoberal OMURA *et al.* (1987), ktorí sledovali ovocný klon a klon zakrpatenej okrasnej formy na médiu Murashige Skoog.

3.4 Význam pestovania *Punica granatum* L.

Podľa ČERVENÁ – ČERVENÝ (2002) obsahujú plody granátovníka 0,9 mg bielkovín, 4,5 g tukov, 16 g sacharidov na 100 g dužiny. Z vitamínov je významný tiamín (vitamín B1), riboflavín (vitamín B2) a vitamín C. V prevencii a podpornej liečbe sa mu pripisujú antibakteriálne, regeneračné, regulačné, antioxidačné a homeopatické účinky, ďalej účinky v prevencii a liečbe nádorových ochorení. Granátovník sa využíva v celej časti od koreňov, cez listy až k plodom. Granátové jablká sa používajú na priamu konzumáciu, spracovanie štiav pre teplú i studenú kuchyňu, prípravu vín a sirupov, majú významné dietetické a liečivé vlastnosti. Sú veľmi dobre transporabilné a majú aj dobrú skladovateľnosť. Z farebnej šťavy, šupky a kvetov sa získavajú rastlinné farbivá. (ŠAMLA, 1994, MLADÁ – PROCHÁZKA, 1987). Plody divorastúceho granátovníka sú hlavným zdrojom výroby kyseliny citrónovej. Kvety obsahujú sýtočervené antokyanínové farbivo. Drevo sa používa na výrobu rôznych predmetov. Pre svoj atraktívny vzhľad a dlhé obdobie kvitnutia si získal obľubu v okrasnom záhradníctve, zväčša v interiérovom pestovaní v tvare bonsaj. Kry granátovníka sa využívajú aj v protieróznych výsadbách (ŠAMLA, 1994).

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1 Charakteristika biologického materiálu

Semená granátovníka púnskeho boli v roku 1991 odobraté z ovocného klonu granátovníka var. *grandiflora*, ktorý pochádzal z bývalého ZSSR. Namáčané boli v rôznych koncentráciách chemomutagénu NaN_3 (0,3 mM, 0,5 mM a 0,7 mM a kontrola bez ošetrovania, iba namáčané vo vode) 20 hodín, potom 2 x premývané v čistej vode po dobu 1 hodiny a vysušené. Následne boli vysiate v skleníku, bez kontroly faktorov prostredia. Neskôr sa pristúpilo k vegetatívnemu množeniu zdrevnatelých odrezkov materských rastlín. Ich zakoreňovanie sa realizovalo v množiarni so zabezpečenou mikroklimou (použitie bielej netkanej textílie) a zavlažovaním (rosením) bez úpravy vody. Ako substrát bol použitý agropelit. V ďalšom roku boli presadené do väčších kontajnerov a následne vegetatívne množené za rovnakých podmienok, bez použitia stimulátora. Začiatkom roka 2001 boli sledované rastliny zostrihnuté na rovnakú výšku a presadené do väčších, rovnakých kontajnerov. Z nich sme ďalej odoberali odrezky za účelom ďalšieho množenia.

Odber odrezkov za účelom vegetatívneho rozmnožovania sa realizoval z nasledovných 4 variant materských rastlín:

- originálne rastliny (bez ovplyvnenia habitusu chemomutagénom),
 - rastliny s koncentráciou 0,3 mM NaN_3 ,
 - rastliny s koncentráciou 0,5 mM NaN_3 ,
 - rastliny s koncentráciou 0,7 mM NaN_3 .
- } ďalej pojem „mutanti“ – ich habitus bol ovplyvnený chemomutagénom azidom sodným (NaN_3) s rôznou koncentráciou

4.1.1 Charakteristika použitého chemomutagénu azid sodný NaN_3 a jeho prejavy v habituse rastlín *Punica granatum L.*

Azid sodný (NaN_3) je jedným z najúčinnějších mutagénov kultúrnych rastlín (jačmeň, kukurica, hrach, a pod.), ktorý sa využíva na šľachtiteľské ciele. Z chemického hľadiska je NaN_3 biela, vo vode dobre rozpustná kryštalická látka. Pripravuje sa reakciou amidu sodného s oxidom dusným ($\text{NaNH}_2 + \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{NaN}_3 + \text{H}_2\text{O}$) (MATUŠKOVIČ – BRINDZA, 1997).

Vplyv chemomutagénu NaN_3 má za dôsledok vo všeobecnosti zmeny v habituse rastliny. Ide o habituálne výnimočné jedince s prejavom mutačnej zmeny pozorovanej na rôznych orgánoch rastlín v porovnaní s originálnymi rastlinami (tab. 1).

Porovnanie habitusu originálnych rastlín a mutantov

Tab. 1

Charakteristika	Originálne rastliny	Mutanti
Rast biomasy	prirodzený, rýchlejší nárast biomasy	pomalší nárast biomasy
Výhonky a letorasty	prirodzený tvar	sploštený tvar a špirálovité zatáčanie vrchnej časti niektorých výhonkov a letorastov
Drevo	popolavo bledá farba	tmavšia, popolavá farba
Listy	prirodzená veľkosť, širšie, bez zmeny, bledšia farba	menšie, užšie, zatáčanie okrajov, tmavšia farba
Kvety	červenej farby, menej tyčiniek, nižší počet okvetných lístkov	ružovočervenej farby, viac tyčiniek, vyšší počet okvetných lístkov
Plody	vytvára	nevytvára

4.2 Charakteristika pokusného miesta

Biologický materiál, z ktorého boli odoberané odrezky určené na zakoreňovanie a taktiež aj výhony určené na ich kultiváciu v podmienkach *in vitro*, bol sledovaný v skleníku S/6 Botanickej záhrady SPU v Nitre.

Zakoreňovanie odrezkov sa realizovalo v množiarni s čiastočne regulovateľnou mikroklimou (použitie netkanej textílie, vetranie, rosenie), ktorá sa nachádza v priestoroch skleníka S/6. Pokus sa realizoval v priebehu rokov 2004 – 2005.

Kultivácia v podmienkach *in vitro* prebiehala v Laboratóriu explantátových kultúr a biomolekulárnych metód (Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, SPU v Nitre) v priebehu rokov 2004 - 2006.

4.3 Aplikované metódy

4.3.1 Vegetatívne rozmnožovanie odrezkami

Jedným z vegetatívnych spôsobov rozmnožovania granátovníka púnskeho je jeho rozmnožovanie odrezkami. Odoberané boli zelené, polodrevnaté a drevnaté odrezky (v závislosti od rastovej fázy a obdobia odberu). Pokus prebiehal počas rokov

2004 a 2005. Rozmnožovanie granátovníka odrezkami prebiehlo z odberov uskutočňovaných v pravidelných 1 - mesačných intervaloch, pričom ich odber sa začal v mesiaci november 2004 a posledný odber odrezkov sa uskutočnil v októbri 2006. Z materských rastlín boli odoberané cca. 12 cm dlhé odrezky, z ktorých boli odstraňované spodné listy. Ponechaných bolo 3-5 vrchných protistojných listov, ktorých plocha bola upravovaná zakracovaním o 1/3 až 1/2 dĺžky. Bazálne časti odrezkov boli pre zväčšenie zakoreňovacej plochy zrezané mierne šikmo (pod uhlom cca. 45 °) a následne krátkodobo (cca. na 5 sekúnd) namáčané v rastových stimulátoroch – Fytohorm, Stimulax I. a Stimulax II. (na báze auxínov a cytokinínov, ktoré podporujú tvorbu koreňovej sústavy a lepšiu ujateľnosť rastlín pri presádzaní). Substrátom pre zakoreňovanie bol agropertil dezinfikovaný Previcurom, do ktorého boli odrezky vkladané mierne šikmo, v počte 5 ks v 2 opakovaniach. Počas procesu zakoreňovania sme sledovali aj vplyv teploty a vlhkosti vzduchu na ujateľnosť odrezkov. Tieto charakteristiky boli zaznamenávané hygrografom, ktorý bol umiestnený v priestoroch množiarne.

Zvolené varianty pri rozmnožovaní odrezkami:

- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ❑ Kontrola (bez rast. stimulátorov), ❑ Fytohorm, ❑ Stimulax I., ❑ Stimulax II. | } | <ul style="list-style-type: none"> ❑ Originálne rastliny (bez NaN_3), ❑ mutanti z koncentrácie 0,3 mM NaN_3, ❑ mutanti z koncentrácie 0,5 mM NaN_3, ❑ mutanti z koncentrácie 0,7 mM NaN_3. |
|---|---|--|

4.3.2 Vegetatívne rozmnožovanie v podmienkach *in vitro*

Ďalšou pracovnou metódou bola aplikácia *in vitro* techník pri mikropropagácii jedincov granátovníka púnskeho (*Punica granatum L.*). Odoberané boli zelené, polodrevnaté a drevnaté odrezky (v závislosti od rastovej fázy a obdobia odberu). Použité boli meristémové a orgánové kultúry. Pokus prebiehal počas rokov 2004, 2005 a 2006. Pri tomto procese sú použité kultivačné médiá podľa Murashige – Skoog (MS, s polovičnou dávkou makroelementov). Ich úlohou je zabezpečiť explantátom živiny a energiu pre delenie a diferenciáciu buniek. Aciditu živných médií pred autoklávovaním sme upravovali na požadované pH v rozmedzí 5,6-5,8. Pre sledovanie eliminácie negatívneho vplyvu polyfenolov sme do niektorých roztokov kultivačných médií pridávali 0,01-1 g PVP. Doba medzi jednotlivými pasážami (prenesenie

explantátu a nové kultivačné médium) a počet pasáží záviseli od prejavov rastových procesov alebo infikovania.

Odber primárnych explantátov (tzv. prípravná 0. etapa) sme realizovali z rôznych nadzemných častí materskej rastliny granátovníka púnskeho s prejavenu mutáciou (vplyvom NaN_3), a to v prevažnej miere z tej časti rastliny, na ktorej sa táto mutačná zmena priamo prejavila (púčiky, očká, nádusy stoniek, vrcholové meristémy), vo vyhovujúcom zdravotnom stave. Z odobratých častí boli odstránené listy, výhonky boli rozdelené na 3 až 5 mm dlhé segmenty a v laminárnom boxe asepticky sterilizované v roztoku alkoholu (80 %) po dobu 30 sekúnd a v roztoku Sava (20 %) po dobu 2-4 minúty, následne niekoľkokrát premyté v destilovanej a potom redestilovanej vode a ukladané na kultivačné médium obohatené o jednotlivé zložky. Dobu sterilizácie sme podľa možnosti predlžovali o 0,5 - 2 minúty za účelom zvýšenie efektívnosti sterilizácie biologického materiálu. Odvodzovanie sterilnej kultúry sa realizovalo približne v dvojtýždňových časových intervaloch. Do každého experimentu sme zaradili po 10 explantátov.

1. etapa: **orgánová kultúra** - použité bolo kultivačné médium na odvodenie sterilnej kultúry, do ktorého boli vkladané primárne explantáty.

2. etapa: **multiplikácia výhonov** - použité bolo kultivačné médium na indukciu axilárnych výhonov. V tejto etape pokusu prebiehala stimulácia tvorby axilárnych výhonov z nádusov stoniek granátovníka odobratých z odvodenej sterilnej kultúry.

3. etapa: **rizogenéza** - použité bolo kultivačné médium na podporu tvorby koreňov. V tejto etape bolo účelom sledovať stimuláciu tvorby koreňov (cca. po 4 týždňoch) z nádusových explantátov po multiplikácii axilárnych výhonov.

Zvolené varianty pri rozmnožovaní v podmienkach *in vitro*:

- MS – kontrola (bez rastov. látok),
 - MS + BAP ($0,3 \text{ mg.l}^{-1}$),
 - MS + NAA ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$),
 - MS + BAP($0,3 \text{ mg.l}^{-1}$) + NAA($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$).
- } □ Originálne rastliny (bez NaN_3),
} □ mutanti z konc. $0,3 \text{ mM NaN}_3$,
} □ mutanti z konc. $0,5 \text{ mM NaN}_3$,
} □ mutanti z konc. $0,7 \text{ mM NaN}_3$.

4.4 Metódy a spôsoby hodnotenia

VEGETATÍVNE ROZMNOŽOVANIE ODREZKAMI

Jednotlivé varianty vegetatívneho rozmnožovania odrezkami sú vyhodnocované po uplynutí doby 10-tich týždňov od vykonania jednotlivých odberov. Hodnotené sú nasledovné kvantitatívne ukazovatele: - počet rastlín s vytvoreným kalusom,

- počet rastlín s vytvorenými koreňkami,
- počet odumretých rastlín.

Ďalej bola úspešnosť tvorby kalusu a koreňkov a počet odumretých jedincov vyhodnocovaná vzhľadom na použitý typ rastového stimulátora (Fytohorm, Stimulax I. a Stimulax II.), typ materskej rastliny pre odber odrezkov, ďalej vzhľadom na termín odberu odrezkov a taktiež aj vzhľadom na teplotné a vlhkostné podmienky v množiarni skleníka S/6, kde prebiehalo ich zakoreňovanie. Vyhodnocovali sme nasledovné:

- vhodný typ aplikovaného stimulátora rastu s ohľadom na obdobie odberu odrezkov (zima, jar, leto jeseň),
- vhodný typ aplikovaného stimulátora rastu za účelom podpory tvorby kalusu a koreňkov a znižovania mortality rastlín,
- najvhodnejší termín odberu odrezkov z hľadiska ich vysokej ujetelnosti,
- optimálnu priemernú dennú teplotu a vlhkosť vzduchu pre proces zakoreňovania,
- najvhodnejší typ rastového stimulátora z hľadiska vysokej ujetelnosti odrezkov,
- najvhodnejší variant materských rastlín *Punica granatum* L. za účelom ďalšieho vegetatívneho rozmnožovania odrezkami.

ROZMNOŽOVANIE V PODMIENKACH *IN VITRO*

Hodnotenie sa uskutočňovalo v priebehu 5-10 dní po zavedení segmentov do kultúry, resp. po ich prepasážovaní na nové živné médium. Počas doby kultivácie boli hodnotené u jednotlivých variantov nasledovné kvantitatívne a kvalitatívne ukazovatele:

- celkový zdravotný stav explantátov,
- mortalitu explantátov,
- tvorbu kalusu,
- počet novovytvorených púčikov na explantáte,
- počet novovytvorených výhonov,
- počet novovytvorených listov,
- počet vytvorených koreňov.

METÓDY MATEMATICKO – ŠTATISTICKÉHO VYHODNOTENIA

Údaje získané pri vegetatívnom spôsobe rozmnožovania odrezkami sme vyhodnocovali popisnou štatistikou a dvojfaktorovým F- testom pre rozptyl, uskutočnenú v štatistickom programe Statgraphic. Ako zdroje variability boli hodnotené jednotlivé varianty ošetrovania báz odrezkov a jednotlivé varianty materských rastlín, z ktorých boli odoberané odrezky za účelom vegetatívneho rozmnožovania. Rozdelenie početností súboru sme charakterizovali strednými hodnotami – modus a medián a na vyjadrenie variačnej miery sme využili smerodajnú odchýlku.

Štatistické spracovanie výsledkov z vegetatívneho spôsobu rozmnožovania *Punica granatum* L. v podmienkach *in vitro* sme robili v programe MS - Excel. Ide o popisnú sumárnu štatistiku hodnotenia variability rastových ukazovateľov pri explantátových kultúrach - suma bodov, aritmetický priemer, medián, smerodajná odchýlka a variačný koeficient.

Klimatický materiál sme štatisticky spracovali metódami numerickými (aritmetický priemer) a metódami grafickými, ktorými sme zobrazili priebeh samotných javov – teploty a vlhkosti vzduchu.

5. VÝSLEDKY

5.1 Zhodnotenie vegetatívneho spôsobu rozmnožovania *Punica granatum* L. odrezkami

ZHODNOTENIE VHODNOSTI APLIKÁCIE STIMULÁTORA RASTU Z HĽADISKA TERMÍNU ODBERU ODREZKOV

Termín odberu odrezkov – ZIMA (december, január, február)

- Z hľadiska tvorby kalusu sa osvedčil prípravok Stimulax II.,
- pre tvorbu korieňkov na odrezkoch zo zimného odberu je vhodné použiť Fytohorm,
- pre zníženie odumierania rastlín má pozitívny vplyv Stimulax II.

Termín odberu odrezkov – JAR (marec, apríl, máj)

- Najlepšia schopnosť tvorby kalusu sa prejavila po aplikácii prípravkom Stimulax II.,
- tvorba korieňkov mala najintenzívnejší priebeh po stimulovaní báz odrezkov rastovým stimulátorom Stimulax I.,
- znižovanie odumierania rastlín bolo zaznamenané po aplikácii prípravku Stimulax II.

Termín odberu odrezkov – LETO (jún, júl, august)

- Z hľadiska tvorby kalusu je vhodné aplikovať prípravok Stimulax II.,
- pre intenzívnu tvorbu korieňkov je najúčinnější stimulátor rastu Fytohorm,
- pre zníženie odumierania rastlín má pozitívny vplyv Stimulax I. a Stimulax II.

Termín odberu odrezkov – JESEŇ (september, október, november)

- Najlepšia schopnosť tvorby kalusu sa prejavila po použití prípravku Fytohorm,
- tvorba korieňkov zaznamenala najintenzívnejšiu schopnosť po ošetrení báz odrezkov regulátorom rastu Stimulax II.,
- znižovanie odumierania rastlín bolo zaznamenané po aplikácii prípravkami Stimulax I. a Stimulax II.

ZHODNOTENIE VHODNOSTI APLIKÁCIE STIMULÁTORA RASTU ZA ÚČELOM PODPORY TVORBY KALUSU A KORIENKOV A ZNIŽOVANIA MORTALITY RASTLÍN

- Celkovo možno zhrnúť, že Stimulax II. sa osvedčil v prevažnej miere z hľadiska vysokej schopnosti vytvárania **kalusu**.
- Najintenzívnejšia schopnosť tvorby **koreňového systému** sa potvrdila po stimulovaní báz odrezkov prípravkom Fytohorm a Stimulax II.
- **Znižovanie mortality** jedincov sme zistili po aplikácii prípravku Stimulax II. a Stimulax I. na bázy odrezkov.

ZHODNOTENIE VHODNOSTI VARIANTU MATERSKEJ RASTLINY Z HĽADISKA TERMÍNU ODBERU ODREZKOV

Termín odberu odrezkov – ZIMA (december, január, február)

- Z hľadiska tvorby kalusu sa jeho najlepšia schopnosť tvorby prejavila na odrezkoch z 0,3 mM a 0,7 mM NaN_3 ,
- pre tvorbu korieňkov je vhodné použiť odrezky z materských rastlín z 0,7 mM NaN_3 ,
- pre zníženie odumierania rastlín majú vysoký vplyv odrezky z 0,3 mM a 0,7 mM NaN_3 .

Termín odberu odrezkov – JAR (marec, apríl, máj)

- Najlepšia schopnosť tvorby kalusu sa prejavila na odrezkoch pochádzajúcich z 0,7 mM NaN_3 ,
- tvorba korieňkov mala najintenzívnejší priebeh pri odrezkoch odobratých z originálnych rastlín,

- znižovanie odumierania rastlín bolo zaznamenané v prípade odrezkov z 0,7 mM NaN_3 .

Termín odberu odrezkov – LETO (jún, júl, august)

- Z hľadiska tvorby kalusu je vhodné odoberať odrezky z originálnych rastlín a 0,7 mM NaN_3 ,
- pre intenzívnu tvorbu koreňkov je optimálne odoberať odrezky z 0,5 mM NaN_3 ,
- pre zníženie odumierania rastlín majú pozitívny vplyv odrezky odobraté z originálnych rastlín, 0,5 mM a 0,7 mM NaN_3 ,

Termín odberu odrezkov – JESEŇ (september, október, november)

- Najlepšia schopnosť tvorby kalusu sa prejavila na odrezkoch z 0,3 mM a 0,5 mM NaN_3 ,
- tvorba koreňkov zaznamenala najintenzívnejšiu schopnosť v prípade odrezkov z 0,7 mM NaN_3 ,
- najnižší počet odumretých odrezkov bol zaznamenaný v prípade ich odoberania zo všetkých hodnotených variantov.

ZHODNOTENIE VHODNOSTI VARIANTU MATERSKEJ RASTLINY ZA ÚČELOM PODPORY TVORBY KALUSU A KORIENKOV A ZNIŽOVANIA MORTALITY RASTLÍN

- Celkovo možno zhrnúť, že odrezky z mutantov s koncentráciou 0,3 mM NaN_3 a 0,5 mM NaN_3 sa osvedčili z hľadiska vysokej schopnosti vytvárania **kalusu**.
- Najintenzívnejšia schopnosť tvorby **koreňového systému** sa potvrdila v prípade odrezkov odobratých z mutantov s koncentráciou 0,7 mM NaN_3 .
- **Znižovanie mortality** jedincov sme zistili v prípade odrezkov pochádzajúcich z mutantov s koncentráciou 0,7 mM NaN_3 .

5.2 Zhodnotenie vegetatívneho spôsobu rozmnožovania *Punica granatum* L. metódou *in vitro*

ZHODNOTENIE NAJVHODNEJŠIEHO VARIANTU MATERSKEJ RASTLINY Z HĽADISKA MINIMALIZOVANIA MORTALITY EXPLANTÁTOV A ZÍSKAVANIA STERILNÝCH JEDINCOV

ROK 2004

- Najnižšie odumieranie jedincov po odvedení sa zistilo po odbere primárnych explantátov z materských rastlín ovplyvnených chemomutagénom s koncentráciou 0,7 mM NaN₃,
- nízky úhyn segmentov po viacnásobných pasážach sme zistili v prípade ich odberu z originálnych rastlín,
- najvyšší počet sterilných rastlín sme zistili pri explantátoch odobratých z originálnych materských rastlín a z mutantov s koncentráciou 0,3 mM NaN₃.

ROK 2005

- Najnižšie odumieranie jedincov po odvedení sme zistili rovnako ako v predchádzajúcom roku 2004, po odbere primárnych explantátov z mutantov materských rastlín s koncentráciou 0,7 mM NaN₃,
- nízky úhyn segmentov po viacnásobných pasážach sme zistili v prípade ich odberu z mutantov s koncentráciou 0,3 mM NaN₃,
- najvyšší počet sterilných rastlín sme zistili pri explantátoch odobratých z mutantov s koncentráciou 0,7 mM NaN₃.

ROK 2006

- Najnižšie odumieranie jedincov po odvedení sme zistili po odbere primárnych explantátov z originálnych materských rastlín,
- nízky úhyn segmentov po viacnásobných pasážach sme zistili v prípade ich odberu z mutantov s koncentráciou 0,3 mM NaN₃, rovnako ako v roku 2005,
- najvyšší počet sterilných rastlín sme zistili pri explantátoch odobratých z originálnych materských rastlín.

6. ZÁVERY A ODPORÚČANIA PRE PRAX

6.1 Zhodnotenie sledovaných charakteristík pri vegetatívnom spôsobe rozmnožovania odrezkami

Z hľadiska vysokej ujamčiteľnosti odrezkov a minimalizovania ich mortality možno predpokladať nasledovné:

- najvhodnejší termín odberu odrezkov - jesenné obdobie (september, október, november), následne letné obdobie (jún, júl, august),

- optimálna priemerná denná teplota pohybujúca sa okolo hodnoty 15 °C pre odrezky z jesenného odberu a 25 °C pre odrezky z letného termínu odberu, a vlhkosť vzduchu 75-90 % pre proces zakoreňovania,
- najvhodnejší typ rastového stimulátora – Stimulax II.,
- najvhodnejší variant materských rastlín *Punica granatum* L. za účelom ďalšieho vegetatívneho rozmnožovania odrezkami – mutant z 0,7 mM NaN₃.

6.2 Zhodnotenie najvhodnejšieho variantu materských rastlín z hľadiska schopnosti vytvárania púčikov, listov, výhonkov, koreňov a kalusu a z pohľadu znižovania mortality jedincov

- Najvyššia schopnosť tvorby púčikov sa osvedčila v prípade odberu primárnych explantátov z originálnych materských rastlín a z mutantov s koncentráciou 0,3 mM NaN₃,
- intenzívna schopnosť tvorby listov bola zistená v prípade odberu primárnych segmentov z mutantov z koncentráciou 0,3 mM NaN₃,
- tvorba výhonkov mala najlepšiu schopnosť v prípade odberu primárnych explantátov z mutantov s koncentráciou 0,5 mM a 0,3 mM NaN₃,
- vytváranie koreňov sa osvedčilo v prípade odberu primárnych explantátov z variantu materských rastlín mutantov s koncentráciou 0,3 mM a 0,7 mM NaN₃,
- kalus sa intenzívne vytváral pri odbere primárnych explantátov z mutantov s koncentráciou 0,7 mM NaN₃ a súčasne bola pri týchto explantátoch zaznamenaná najnižšia mortalita.

6.3 Odporúčania pre prax

- pestovanie *Punica granatum* L. v našich klimatických podmienkach je z ovocinárskeho hľadiska dosahovania produkcie problematické a naďalej skúmané, a preto je vhodné zdôrazniť jeho dekoratívnu funkciu pre interiérové a exteriérové pestovanie v podobe mobilnej kontajnerovej zelene (cez kvety a neskôršie aj plody, vid' prílohy),
- sú možnosti využitia mutačného prejavu pomalšieho nárastu biomasy a atypických tvarov dreva pre pestovanie bonsajových miniatúr,

- je potrebné hľadať ďalšie možnosti zvyšovania efektívnosti rozmnožovania z hľadiska kvantity i kvality sadbového materiálu a dosiahnuť tak čo najvyšší množiteľský koeficient,
- zabezpečiť možnosť regulácie mikroklimatických podmienok v priestore, kde prebieha zakoreňovanie odrezkov a tak optimalizovať teplotu a vlhkosť vzduchu pre tento proces,
- robiť odber odrezkov s pätkou pri rozmnožovaní odrezkami za účelom zväčšenia plochy pre pôsobenie stimulátorov rastu a rýchlejšej tvorby koreňového systému,
- možnosť overenia životaschopnosti a originality mutantov na úrovni DNA,
- sledovať prejav mutačných zmien v habituse materských rastlín a prenos týchto znakov na ďalšie generácie potomstva získané vegetatívnym spôsobom rozmnožovania odrezkami aj cestou explantátových kultúr,
- dôležitá je introdukcia materských rastlín zo skleníkových do prírodných klimatických podmienok pre optimálny priebeh dormancie, vyzretie pletív a celkové ozdravenie biologického materiálu určeného na vegetatívne rozmnožovanie,
- vyšpecifikovať vhodný typ kultivačného média pre *Punica granatum* L., optimalizovať dobu sterilizácie primárnych explantátov a eliminovať hnednutie pletív, bakteriálne a hubové infekcie explantátov prostredníctvom optimálnej koncentrácie účinných chemických prípravkov,
- využiť informácie z predkladaného deskriptora pre udržovacie šľachtenie,
- využitie exotických druhov rastlín, akou je aj granátovník púnsky (*Punica granatum* L.), a ich zvláštnosti môžu prispieť k obohateniu pestovaného sortimentu, a to nielen v ovocnej forme, ale aj okrasnej.

7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- COLOV, C. N. 1985. Ovošarstvo na tropika i subtropika. Sofia: Zemizdat, 1985, 258 s.
- ČERVENÁ, D. – ČERVENÝ, K. 2002. Liečba výživou. 2.vyd., 2002, 213 s. ISBN 80-88892-48-1
- HUŠÁK, S. - TÁBORSKÝ, V., VALÍČEK, P. 1996. Tropické a subtropické ovoce, pěstování a využití. Praha: Brázda, 1996, 125 s. ISBN 80-209-0258-9

- MATUŠKOVIČ, J. – BRINDZA, J. 1997. Vplyv chemomutagénu NaN₃ na formovanie habitusu rastlín granátového jablka. Záverečná správa (VE-A-34/01/5), SPU Nitra, september 1997, s. 10-11.
- MLADÁ, J. – PROCHÁZKA, F. 1987. Atlas cizokrajných rastlín. Praha: SZN, 1.vyd., 1987, 342 s.
- NOWAK, B. – SCHULZOVÁ, B. 2002. Tropické plody. Ikar, a.s.: Bratislava, 2002, 240 s. ISBN 80-551-0318-6
- OMURA, M. – MATSUTA, N. – MORIGUCHI, T. – KOZAKI, I. 1987. Vedľajšie výhonky a formovanie priesad z kultúrnych listových explantátov granátovníka púnskeho. In.: Hort Science, 1987, s.133-134.
- ŠAMLA, J. 1994. Subtropy. Pěstiteľské praktikum. 2. Brno: Citrusář, 1994, 148 s.
- TRUHLÁŘ, V. 1987. Pestujeme južné ovocie. Příroda: Bratislava, 1. vyd., 1987, 128 s.
- VILKUS, E. *et al.* 2000. Rozmnožování ovocných a okrasných dřevin – Základy školkařství. Český zahrádkářský svaz, nakladatelství Květ, Praha, 2. vyd., 2000, 103 s. ISBN 80-85362-32-5
- VOLF, F. *et al.* 1988. Zemědělská botanika. Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1. vyd., 1988, 273 s.
- <http://www.unifi.it/project/ueresgen29/ds2.html>, 2006-05-05

8. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA

- MATUŠKOVIČ, J., MIČUDOVIČ, O., FILOVÁ, A. 2004. Fyziologicky aktívne látky v procese mikropropagácie *Punica granatum L.* In: Acta horticulturae et regioteecturae – Mimoriadne číslo. Nitra: SPU, 2004, roč. 7, s. 104-105. ISSN 1335-2563
- MATUŠKOVIČ, J., MIČUDOVIČ, O. 2004. Biologické podmienky pestovania granátového jablka (*Punica granatum L.*). Proceedings from the International Bioclimatological Workshop – Climate Change – Weather Extremes Organism and Ecosystems, Zborník anotácií z medzinárodnej vedeckej konferencie, Viničky, 2004, s. 45. ISBN 80-8069-402-8
- MATUŠKOVIČ, J., MIČUDOVIČ, O. 2005. Naše skúsenosti s pestovaním granátového jablka. In: Zahradníctví, 2005, č. 2, s. 42-43. ISSN 12 12 37 81

- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.** 2005. Možnosti rozširovania genofondu *Punica granatum L.* In: Zborník zo 4. odborného seminára s medzinárodnou účasťou – Hodnotenie genetických zdrojov rastlín. Piešťany: VÚRV, 25.-26. máj 2005, s. 186-187. ISBN 80-88790-38-7
- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.**, ANTALÍKOVÁ, M. 2005. Rozširovanie genofondu cudzokrajných ovocných druhov na Slovensku. Zborník prednášok - VII. zjazd a valné zhromaždenie Slov. spoloč. pre poľnohosp., lesn. a veterin. vedy pri SAV, A. Poľnohospodárska sekcia, Bratislava, 8. september 2005, s. 47-50. ISBN 80-227-2308-8
- **MIČUDOVÁ, O.**, ANTALÍKOVÁ, M., VARGOVÁ, H. 2005. Cudzokrajné ovocné druhy na univerzitnej pôde. Science of the Youth 2005, 3rd International Scientific Conference – zborník abstraktov, Galanta – Kaskády, 21.-22. september 2005, s. 30-31. ISBN 80-8069-584-9
- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.** 2006. 5 krokov k dobrej úrode. In: Záhradkár, 2006, roč. XLII, č. 5, s. 10-11. ISSN 0862-5565
- ANTALÍKOVÁ, M., **MIČUDOVÁ, O.** 2006. Páčia sa vám exotické rastliny. In: Záhradkár, 2006, roč. XLII, č. 5, s. 36-37. ISSN 0862-5565
- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.**, ANTALÍKOVÁ, M. 2006. Bioclimatological conditions of atypical fruit trees. Bioclimatology and Water in the Land, International Bioclimatological Conference – zborník abstraktov, Strečno, 11.-14. september 2006, s. 98. ISBN 80-89186-12-2
- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.** 2006. Practices with chemical mutagen (natrium azide) on growth habit *Punica granatum L.* I. International Symposium on pomegranate and Minor Mediterranean Fruits – zborník abstraktov, Adana – Turkiye, 16.-19. september 2006, s. 41.
- MATUŠKOVIČ, J., **MIČUDOVÁ, O.**, JURÍK, I., ANTALÍKOVÁ, M., VARGOVÁ, H., POKORNÁ, T. 2006. Some well-known and lesser-known fruits from an academic point of view. International Conference of Perspectives in European Fruit Growing – zborník príspevkov, Lednice – Czech Republic, 18.-20. October 2006, s. 63-67. ISBN 80-7157-975-0
- **MIČUDOVÁ, O.**, MATUŠKOVIČ, J. 2006. Exogenous factors influenced on vegetative propagation proces of *Punica granatum L.* International Conference of Perspectives in European Fruit Growing – zborník príspevkov, Lednice – Czech Republic, 18.-20. October 2006, s. 243-244. ISBN 80-7157-975-0