

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV SILVA TAROUČY PRO KRAJINU
A OKRASNÉ ZAHRADNICTVÍ, v. v. i.
Průhonice**



BIOTECHNOLOGICKÉ POSTUPY PRO ROZŠÍŘENÍ VARIABILITY U LUSKOVIN

Certifikovaná metodika č. 1/2020–057

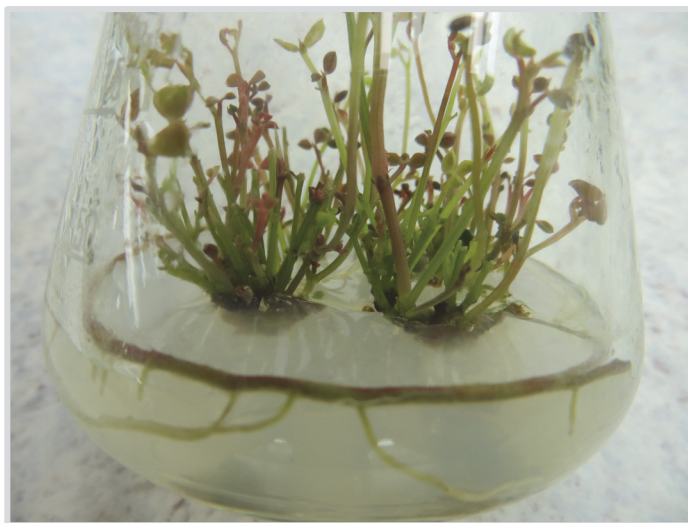


Foto: J. Šedivá

2020

Metodika „*Biotechnologické postupy pro rozšíření variability u luskovin*“ byla vypracovaná jako výstup projektu TH03030050 Technologické agentury ČR („Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod“).

Autoři

Ing. Jana Šedivá, Ph.D., Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. (VÚKOZ, v.v.i.), Průhonice, sediva@vuko-z.cz

Ing. Marie Greplová, Ph.D., Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., greplova@vubhb.cz

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D., AGRITEC, výzkum šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, smykalova@agritec.cz

Ing. Hana Drahošová, Ph.D., Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. (VÚKOZ, v.v.i.), Průhonice, drahosova@vuko-z.cz

Oponenti

Ing. Michaela Budňáková, Ministerstvo zemědělství České republiky, Těšnov 65/17, 11 000 Praha, michaela.budnakova@mze.cz

Prof. Ing. Eloy Fernández Cusimamani, Ph.D., Česká zemědělská univerzita Praha, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6-Suchbát, eloy@ftz.czu.cz

© Foto – Ing. Jana Šedivá, Ph.D., Ing. Marie Greplová, Ph.D.

ISBN 978-80-87674-34-5 (VÚKOZ, v. v. i., Průhonice)

ISBN 978-80-87360-64-4 (AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk)

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na autora.

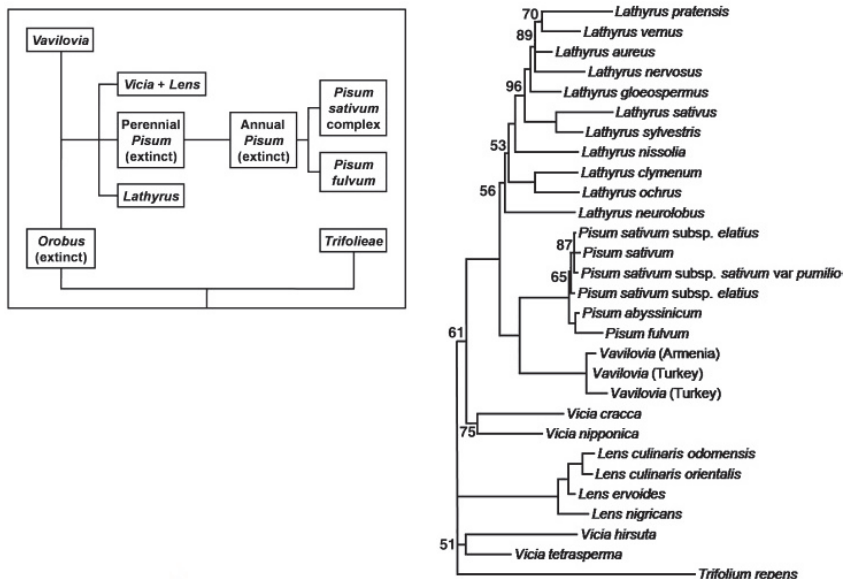
OBSAH

1	Úvod	5
2	Cíl metodiky	9
3	Srovnání novosti postupů	9
4	Vlastní popis metodiky	10
4.1	Polyploidizace <i>Vavilovia formosa</i>	10
4.1.1	Rostlinný materiál.....	10
4.1.2	Indukce tetraploidních materiálů	10
4.1.3	Měření stupně ploidie	12
4.1.4	Produkce zakořeněných rostlin.....	13
4.2	Protoplastové kultury	15
4.2.1	Rostlinný materiál.....	15
4.2.2	Kultivace rostlin a příprava donorového materiálu	15
4.2.3	Izolace protoplastů z listového mezofylu	18
4.2.4	Kultivace protoplastů.....	18
4.2.5	Kontrola sterility použitých roztoků.....	20
4.2.6	Složení roztoků/kultivačních médií	20
4.2.7	Shrnutí	21
4.3	Použité zkratky	22
5	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	23
6	Ekonomické aspekty	23
7	Seznam použité literatury	23
8	Seznam publikací, které předcházejí metodice	25
9	Dedikace.....	26

1 ÚVOD

Hrách setý (rod *Pisum* L.) je významná luskovina z čeledi *Fabaceae*, patří k nejstarším kulturním plodinám. Jedná se o jednoletou plodinu, existují také formy ozimé (forma *hybernum*). Plodem jsou lusky se semeny s vysokým obsahem bílkovin (25 %), velkým množstvím vitaminů (hlavně skupiny B) a minerálních látek, zvláště fosforu a draslíku, ale i vápníku a hořčíku. Hrách patří mezi plodiny šetrné k půdě, je schopný získávat vzdušný dusík s využitím hlízkových bakterií. Pro tuto vlastnost se využívá jako výborná předplodina, a to zejména pro listovou zeleninu nebo ozimé obilniny. Příznivé podmínky pro pěstování hrachu jsou v mírném podnebí. Hrách je náročný na vláhu ve vegetativní fázi růstu. Optimální vlhkost půdy je 60 % vodní kapacity (ÚZPI, 1996). Šlechtění hrachu má v ČR velkou tradici. Výhodou českých odrůd je jejich adaptace na zdejší podmínky. V současné době roste spotřeba hrachu v ČR. Postupná změna klimatických podmínek vyvolává potřebu vyšlechtit nové genotypy, které by byly odolné především k suchu.

Plané druhy (formy) hrachu lze využít pro rozšíření variability hrachu a získání odolných genotypů. Jedná se o například o *Pisum fulvum*, *P. elatius*, *P. abyssinicum* a *Vavilovia formosa*, které jsou cenným zdrojem genů rezistence vůči biotickým a abiotickým druhům stresu, a to jak v klasických, tak i biotechnologických postupech (**Obrázek 1**, Mikić a kol. 2013).



Obr. 1: Potenciální nositelé genů rezistence vůči biotickým a abiotickým druhům stresu u hrachu a modely pro vzdálenou hybridizaci (Mikić a kol. 2013)

Vavilovia formosa (Stev.) syn. *Pisum formosum* je původní rostlinný druh náležící k čeledi *Fabaceae*. Jedná se o planý druh luskovin, který je evolučně příbuzným současných komerčních druhů luskovin jako hrách setý (*Pisum sativum* L.), hrachor setý (*Lathyrus sativus* L.), bob setý (*Faba vulgaris* L.), vikev setá (*Vicia sativa* L.) a čočka kuchyňská (*Lens culinaris* Medik.). Z taxonomického hlediska rody luskovin zahrnují řádově 10–100 druhů, rod *Vavilovia* pouze jeden druh a tím je *Vavilovia formosa*. Jedná se o vytrvalý druh nízkého vzrůstu. Ochatt a kol. (2016) provedl vstupní studii zaměřenou na velikost genomu a zjistil vysokou podobnost mezi *Vavilovia* a *Pisum*. Místa výskytu jsou střední a východní Kavkaz, zejména Rusko, Ázerbájdžán, Arménie, Irán, Irák, Libanon, Sýrie a Turecko. Podrobnější specifikace tohoto druhu a jeho výskytu jsou uvedeny v publikacích Mikić a kol. (2009), Akopian a kol. (2010), Mikić a kol. (2013, 2014) a Visnyakova a kol. (2016). Důležitým aspektem u tohoto druhu je jeho křížitelnost s ostatními příbuznými rody, zejména s rodem *Pisum* (Golubev 1990, Shafer a kol. 2012), a je tak potenciálně významným donorem některých vlastností (odolnost k abiotickým a biotickým

stresům). Naopak nevýhodou u *V. formosa* je endemický výskyt. Jedná se o chráněný druh zapsaný v červené knize ohrožených druhů.

Pro rozšíření genetické variability jsou používány ve šlechtitelských programech biotechnologické metody. Na rozdíl od klasických metod šlechtění u rostlin dochází k procesu tvorby nových genotypů ve sterilních podmínkách. Tyto podmínky umožňují manipulaci a regeneraci rostlin až na úrovni buněčných struktur, což v normálních, nesterilních podmínkách není možné. Výhodou *in vitro* kultivace rostlinných explantátů je regulace kultivačních podmínek jako např. složení živného média, regulace intenzity a složení světla, délky dne a regulace teploty. Mezi významné biotechnologické metody, které se používají ve šlechtitelských programech, jsou indukovaná polyploidizace a somatická hybridizace.

Indukovaná polyploidizace je založena na indukovaném zdvojení chromozomové sady pomocí antimitotického činidla. Velkou předností této metody je rozšíření genetické variability v krátké době v porovnání s klasickými metodami šlechtění (Song a kol. 1995). Polyploidie se změněným fenotypem disponují novými cennými vlastnostmi významnými pro ekologii a zemědělství (Tamayo-Ordóñez a kol. 2016). Polyploidní genotypy, které vznikly přirozenou cestou nebo byly vytvořeny uměle, hrají klíčovou roli ve šlechtění rostlin (Sattler a kol. 2016). Metoda mitotické polyploidizace byla v zemědělství poprvé aplikována v 30. letech dvacátého století na rostliny pěstované ve volné půdě. Klíčovým momentem v rozvoji této technologie byl objev antimitotického činidla kolchicinu, který narušuje proces tvorby dělicího vřeténka během buněčného dělení (mitózy). Kolchicin je alkaloid, který je extrahován ze semen a cibulí ocunu jesenního (*Colchicum autumnale* L.), a patří mezi nejčastěji používané antimitotické činidlo. Je vysoce účinný, ale musí se aplikovat ve vysokých dávkách. Pro člověka je velmi toxický. Tyto důvody vedly k hledání dalších chemikálií s podobným účinkem, které by částečně nahradily kolchicin. Bylo zjištěno, že některé herbicidy mají polyploidizační efekt, a některé z nich byly testovány na rostlinách. Z této skupiny se uplatnil především oryzalin, který byl v posledních letech úspěšně aplikován u řady rostlinných druhů (Dhooghe a kol. 2011).

Ve sterilních podmínkách (*in vitro*) byla poprvé polyploidizace úspěšně provedena v 60. letech dvacátého století u tabáku. Současně s rozvojem explantátových kultur docházelo také k většímu uplatnění mitotické polyploidizace, vzhledem k možnosti nastavení kultivačních podmínek a aplikací na rozličné typy explantátů jako jsou kalus, vrcholy, pupeny,

výhony, nodální segmenty, celé rostlinky, somatická nebo zygotická embrya, semena, semenáčky a části hlíz. Úspěšnost této metody v *in vitro* podmínkách je závislá na mnoha faktorech. Mezi významné patří výběr, koncentrace, doba působení a způsob aplikace mitotického činidla. Velmi významnou roli hraje také senzitivita rostlinného druhu/genotypu. Od 90. let dvacátého století byla mitotická polyploidizace v *in vitro* podmínkách aplikována u mnoha rostlinných druhů.

Základním předpokladem pro využití biotechnologických postupů ve šlechtitelských programech je úspěšná regenerace rostlin a převod do nesterilních/normálních podmínek. Pro stanovení ploidie se u rostlin používá několik metod, které jsou založeny na různých hodnotících parametrech. V současné době je nejvíce používanou metodou flow-cytometrie (Dhooghe a kol. 2011). Metoda je založena na záznamu vybraných optických vlastností, nejčastěji intenzity fluorescence jednotlivých částic (např. buněk). Jedná se o metodu jednoduchou, rychlou, nezávislou na dělicích se buňkách a ze všech nynějších metod nejspolehlivější. Na druhou stranu se pro měření ve většině případů používá čerstvý rostlinný materiál, což může být někdy problém, zvláště když se pracuje v terénu (Suda 2005). Druhou nejčastěji používanou metodou je počítání chromozomů v dělicích se buňkách. Tato metoda nabízí jednoznačnou determinaci ploidie, je však velmi pracná a pletiva obsahující dělicí se buňky nemusí být snadno dostupná (Doležel a kol. 2007). Další méně používané metody, které jsou založeny na morfologických a anatomických parametrech jako jsou velikost a hustota průduchů, velikost pylových zrn apod., nejsou dostatečně spolehlivé a používají se jako doplňkové.

Somatická hybridizace využívající fúzi protoplastů je jednou z alternativ tam, kde konvenční metody hybridizace nejsou pro bariéry vzájemné křížitelnosti uplatnitelné (Gatti a kol. 2016). Pracuje se s buňkami zbavenými buněčných stěn, protoplasty, které představují systém analogický ke splývání pohlavních buněk. Cílem hybridizace je vnesení žádoucích znaků (rezistence k biotickým a abiotickým činitelům), v našem případě z planých druhů do kulturních, a tím rozšíření genetické variability (Pang a kol. 2000; Gatti a kol. 2016; Pratap a kol. 2018). Přestože metoda izolace protoplastů působením specifických enzymů byla zvládnuta už v 60. letech dvacátého století (Gamborg a kol. 1981), u luskovin svědčí o vzdornosti (rekalcitranci) a významné genotypové závislosti (Jia 1982; Puonti-Kaerlas and Eriksson 1988, Ochatt a kol. 2000).

V rámci obecného postupu izolace a kultivace (případně izolace, fúze a kultivace) protoplastů existuje celá řada kroků, které mohou být genotypově specifické s nízkou mírou opakovatelnosti (Pang a kol. 2000). Za optimálních kultivačních podmínek lze navodit regeneraci buněčných stěn, následně buněčné dělení, embryogenezi/organogenezi, až regeneraci celistvých rostlin. K faktorům, které regeneraci významně ovlivňují, patří fyziologický stav zdrojového pletiva, volba a koncentrace enzymů, doba jejich působení, složení kultivačních médií, typ a koncentrace osmotického činidla, kombinace a koncentrace růstových regulátorů a odezva (responsivita) genotypu (Long a kol. 1996). Úspěšných regenerací prýtlů nebo i celistvých rostlin bylo dosaženo u několika zástupců z čeledi bobovitých (*Fabaceae*) např. u *Vigna sublobata* L. (Bhadra a kol. 1994), *Vigna sinensis* (Li a kol. 1995), *Pisum sativum* L. (Böhmer a kol. 1995; Ochat a kol. 2000; Puonti-Kaerlas a Eriksson 1988; Lehminge-Mertens a Jacobsen 1989). Jako zdrojová pletiva byla testována pletiva hypokotylů, epikotylů, děloh nebo listů. Fúze protoplastů u *Pisum sativum* a *Glycine max* dovedené do stádia dělení heterokaryonů byla popsána (Constabel a kol. 1975, 1976). Byli popsány fúze *P. sativum* a *Lathyrus sativus* s dosažením regenerace do stádia kalusů (Durieu a Ochat, 2000), dále fúze *Phaseolus vulgaris* a *P. coccineus*, *P. vulgaris* a *P. polyanthus* do stádia buněčných mikrokolonií (Geerts a kol. 2008). I přes limity má somatická hybridizace potenciál. Všechny jednotlivé již dosažené pokroky u čeledi *Fabaceae* jsou cenným základem k dalšímu poznání na tomto poli.

2 CÍL METODIKY

Metodika je zaměřena na vývoj a optimalizaci dvou biotechnologických postupů u rodů *Vavilovia* a *Pisum*. Cílem metodiky je vypracování polyploidizačního protokolu pro získání tetraploidních rostlin *V. formosa* a protokolu pro kultivaci donorových rostlin, izolaci a kultivaci protoplastů u zástupců rodu *Pisum* a *V. formosa* jako předpokladu pro navazující somatickou hybridizaci. Uvedené postupy budou využitelné při tvorbě nových šlechtitelských materiálů pro získávání odrůd hrachu odolných k nepříznivým podmínkám prostředí.

3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost předložené metodiky spočívá ve vypracování úspěšného polyploidizačního protokolu pro *V. formosa*, který v literatuře doposud nebyl

popsán. K indukci tetraploidů dochází v *in vitro* podmínkách v tekutém indukčním médiu za přítomnosti antimitotického činidla.

Metodika u protoplastových kultur přináší optimalizovanou metodu izolace protoplastů z listového mezofylu pro soubor zástupců rodu *Pisum* a pro *V. formosa*. Předložená metodika popisuje podmínky kultivace donorových rostlin a vlastní postup izolace protoplastů. Somatická hybridizace obecně dosud není u čeledi *Fabaceae* adaptována (Pratap a kol. 2018). U tzv. vzdorných genotypů (rekalcitrance) musí být jednotlivé kroky k vytvoření funkčního protokolu řešeny individuálně (Assani a kol. 2006).

4 VLASTNÍ POPIS METODIKY

4.1 POLYPLOIDIZACE *VAVILOVIA FORMOSA*

Polyplodizační protokol se skládá z několika fází:

- příprava rostlinného materiálu
- polyploidizace pomocí oryzalinu
- determinace stupně ploidie
- produkce rostlin

4.1.1 Rostlinný materiál

Experimenty byly zahájeny s využitím dlouhodobých *in vitro* multiplikačních kultur *V. formosa*, které poskytl AGRITEC, výzkum šlechtění a služby, s. r. o., Šumperk. Meriklony – výhonové kultury byly odvozeny z jednoho *in vitro* semenáčku. Semena byla poskytnuta Botanickým ústavem v Jerevanu, Arménie.

4.1.2 Indukce tetraploidních materiálů

Jako donorový explantát je vhodný u *V. formosa* segment výhonku. Explantát se skládá z vrcholu a jednoho nódu s úžlabními pupeny. Před vlastní aplikací antimitotického činidla je vhodná předkultivace výhonkových explantátů na MS základním médiu včetně vitaminů (Murashige a Skoog, 1962) po dobu tří dnů (**Obrázek 2**). Předkultivace zlepšuje účinek antimitotického činidla (Chauvin a kol. 2005).

Postup při přípravě indukčního média je takový, že se namíchá základní MS médium, upraví se pH pomocí NaOH. Médium se sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C/20 min.

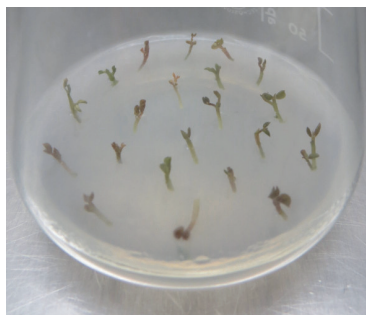
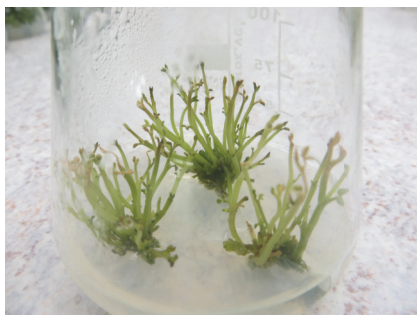
Příprava sterilního oryzalinu a další manipulace se sterilním médiem a explantáty probíhají ve flow-boxu. Nejdříve se oryzalin rozpustí v 1 M roztoku NaOH (Dhooghe a kol. 2009), doplní se destilovanou vodou a zásobní roztok se přefiltruje ve flow-boxu přes sterilní mikrofiltr 0,2 μm (Whatman). Sterilní MS médium se rozpipetuje po 50 ml do sterilních 100ml Erlenmeyerových baněk, po vychladnutí se k médiu doplní sterilní oryzalin. Předkultivované explantáty se vyjmou z kultivační nádoby a po deseti se vloží do baněk s indukčním tekutým médiem. Baňky s explantáty se umístí na třepačku (Labnet), která je umístěna v kultivační místnosti (16/8 hod. fotoperioda, 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 23 ± 1 °C). Po 48 hod. se explantáty vyjmou z indukčního média na filtrační papír (odstranění zbytku média) a pak se umístí na základní tuhé MS médium bez oryzalinu. Explantáty, které vykazují růstovou aktivitu, se každé 3–4 týdny přemístí na čerstvé kultivační médium. Minimálně po dvou pasážích se u explantátů změří stupeň ploidie pomocí flow-cytometru.

Základní/indukční* MS médium:

- 4,4 g/l makro a mikro elementů včetně vitaminů (glycin, myo-inositol, kyselina nikotinová, pyridoxin HCl, thiamin HCl) (Duchefa, The Netherlands)
- 0,5 mg/l BAP
- 0,1 mg/l IBA
- 20 g/l sacharózy
- 7 g/l agaru
- 150 μM oryzalin*
- pH 5,8

* oryzalin se doplní pouze do indukčního média

Pro indukci polyploidních materiálů je u *V. formosa* efektivní použít oryzalin, který je aplikován na výchozí explantát v tekutém indukčním médiu. Pro tvorbu polyploidních genotypů není vhodná aplikace oryzalinu v nízkých koncentracích (0,5; 1,0; 3,0 a 10 μM) v indukčním médiu zpevněném agarem s dlouhou dobou působení (5 týdnů).



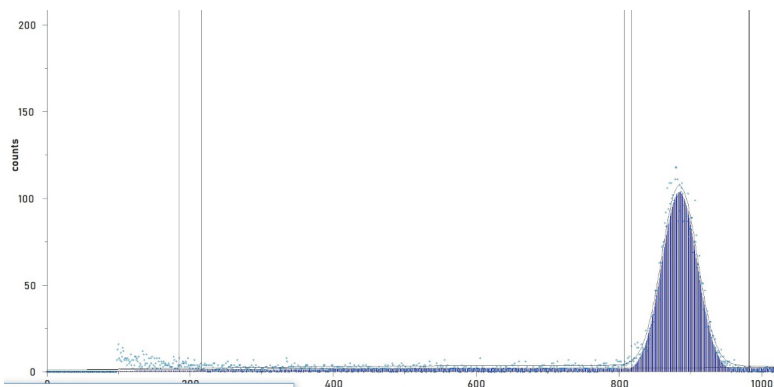
Obr. 2: Vícevýhonová *in vitro* kultura *V. formosa* jako zdroj explantátů pro indukci tetraploidních materiálů; předkultivace stonkových explantátů před aplikací oryzalinu

4.1.3 Měření stupně ploidie

Ověření stupně ploidie je v současné době nejspolehlivější cytometricky na průtokovém cytometru. Měření u *V. formosa* bylo provedeno na zařízení flow-cytometr (CyFlow®Space, Sysmex).

Rostlinný materiál se odebere z *in vitro* kultury, upraví a změří se. *V. formosa* má drobné listy, proto se odebere 2–5 výhonů s listy (v délce 2 cm). Výhony se vloží do Petriho misky (průměr 60 mm) přidá se 0,4 ml vychlazeného hypotonického roztoku pro extrakci DNA (Nuclei Extraction Buffer, Sysmex) a ostrou žiletkou se vzorek naseká (30–60 s). Jedna žiletka je použitelná pro dva vzorky. Zpracováváme vždy několik vzorků najednou, inkubace se pohybuje od 1–5 min. Poté se vzorky přepipetují do zkumavky s filtrem (50 μ m, CellTrics®), pro každý vzorek se použije nový filtr. K přefiltrovanému vzorku se přidá 1,6 ml barvicího pufru (Staining Buffer, Sysmex) a po krátké inkubaci (60–30 s) se vzorky změří na flow-cytometru (**Obrázek 3**). Jako standard se pro kalibraci použijí diploidní *in vitro* kultury ($2n = 2x$).

Pro potvrzení tetraploidních materiálů se vzorky 3krát přeměří, vždy s časovým odstupem (po pasáži na čerstvé základní médium).

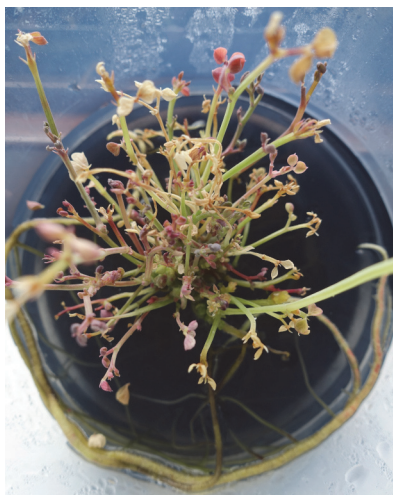


Obr. 3: Cytometrická detekce tetraploidního klonu *V. formosa* na flow-cytometru

4.1.4 Produkce zakořeněných rostlin

Po potvrzení tetraploidních *in vitro* kultur se rostlinný materiál *V. formosa* namnoží (multiplikace). K multiplikaci se použije základní MS médium. Optimální je pasáž svazku výhonů (> 5 výhonů/explantát), aby došlo k rychlé regeneraci nových výhonů. Multiplikace jednovýhonových explantátů vyžaduje dvojnásobnou dobu v porovnání s kultivací svazků. Multiplikace výhonů probíhá ve 100ml Erlenmeyerových bankách s 25 ml základního MS média včetně vitaminů.

Tvorba kořenů probíhá v *in vitro* podmínkách. Pro indukci kořenů se používá svazek výhonů (> 10 výhonů), jednotlivé výhony pro zakořeňování jsou nevhodné. Explantáty umístíme na WPM médium (Lloyd a McCown 1980) s poloviční koncentrací solí (Duchefa), s přidavkem auxinů IBA a NAA v koncentraci 1 mg/l. Po 12 týdnech kultivace explantátů na zakořeňovacím médiu dochází k tvorbě kořenů (25–30 %). Rhizogeneze je u *V. formosa* velmi obtížná. Pro další vývoj kořenového systému jsou zakořenělé rostliny přeneseny do větších kultivačních nádob s WPM médiem bez růstových regulátorů a s přidavkem 1 g/l aktivního uhlí. Po 12 týdnech se rostliny vyjmou z kultivačních nádob, pod tekoucí vodou se odstraní zbytky média (**Obrázek 4**). Rostliny se ponoří do roztoku Previcuru (2 ml/l) na 1 min a pak se nasází do nádoby se sterilním keramzitem (**Obrázek 5**). Rostliny se zalijí tekutým MS médiem s poloviční koncentrací solí (Duchefa) a nádoby se umístí do miniskleničků s víkem (Minipa) v kultivační místnosti. Pravidelně se odstraňují nekrotické výhony.



Obr. 4: Rostlina *V. formosa* s vyvinutým kořenovým systémem před výsadbou do nesterilních podmínek; detail rostliny



Obr. 5: Rostlina *V. formosa* po 8 týdnech pěstování v nesterilních podmínkách, detail listů

4.2 PROTOPLASTOVÉ KULTURY

Všechny kultivace a manipulace s rostlinným materiálem probíhají ve sterilním prostředí.

4.2.1 Rostlinný materiál

In vitro kultury planých druhů rodu *Pisum* a *V. formosa* byly získány z pracoviště AGRITEC, výzkum šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk.

4.2.2 Kultivace rostlin a příprava donorového materiálu

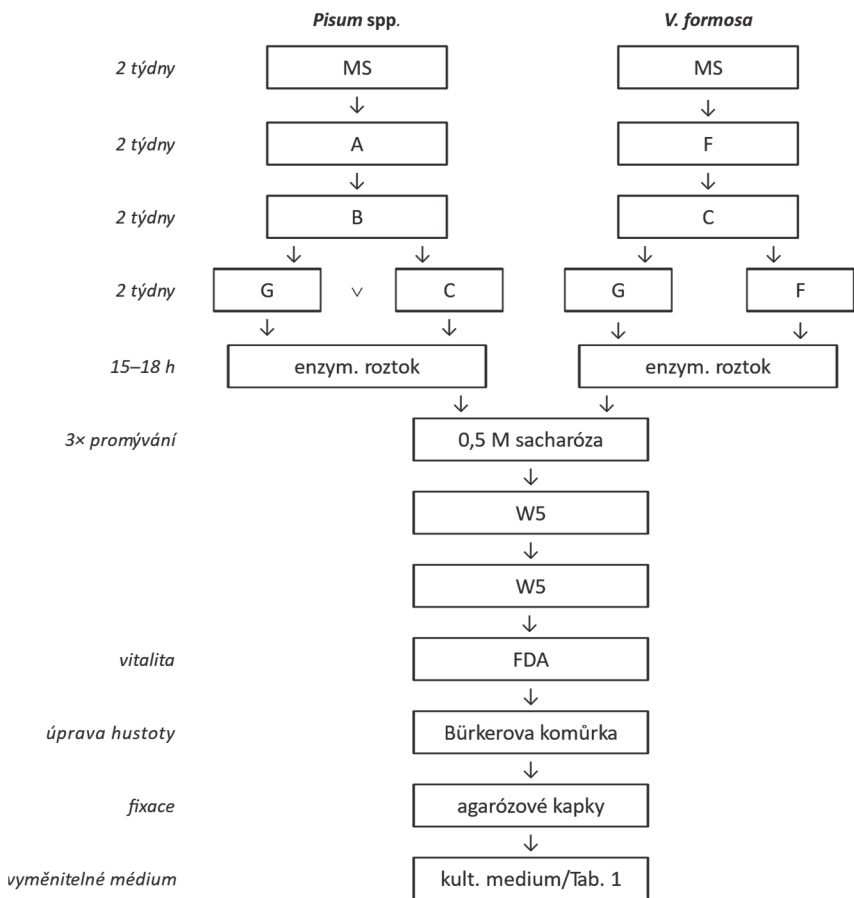
Dlouhodobější udržování kultur probíhá na pevném základním MS médiu včetně vitaminů bez růstových regulátorů s frekvencí pasáže ve dvoutýdenních intervalech. Fyzikální parametry *in vitro* kultivace jsou 16/8 hod. fotoperioda, intenzita osvětlení $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a teplota $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Schematický postup je uveden na **Obrázku 6**. Složení kultivačních médií je uvedeno v kapitole 4.2.6.

Pisum ssp.

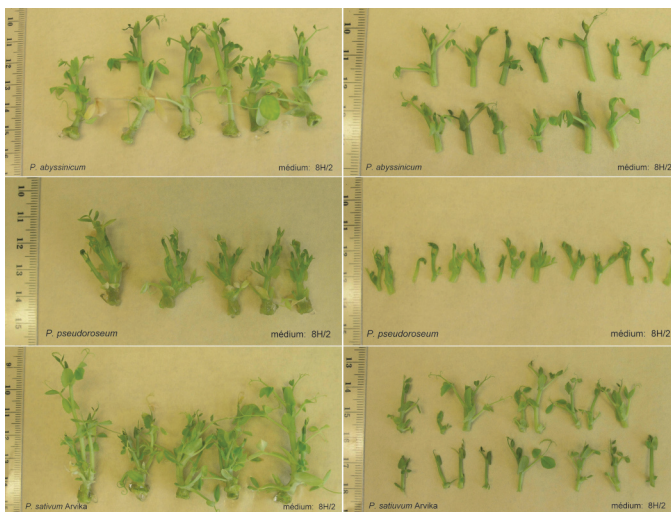
- zpomalení stárnutí pletiv a zvýšení obsahu chlorofylu na médiu A
- multiplikace na médiu B (**Obrázek 7**)
- produkce donorového pletiva na médiu G (**Obrázek 8A**), alternativně na médiu C

V. formosa

- zpomalení stárnutí na médiu F (**Obrázek 9A**)
- multiplikace na médiu C (**Obrázek 9B**)
- produkce donorového pletiva na médiu G (**Obrázek 8B**), alternativně na médiu F



Obr. 6: Schéma postupů pro přípravu protoplastových kultur a jejich založení pro rod *Pisum* a *V. formosa*



Obr. 7: Multiplikace na médiu B – zástupci rodu *Pisum*



Obr. 8A Příprava donorů listového mezofylu na médiu G – rod *Pisum*

Obr. 8B Příprava donorů listového mezofylu na médiu G – *V. formosa*



Obr. 9A Zpomalení stárnutí na médiu F - *V. formosa*



Obr. 9B Multiplikace na médiu C – *V. formosa*

4.2.3 Izolace protoplastů z listového mezofylu

Příprava rostlin

Rostliny kultivované na QL médiích se umístí 24 hodin před vlastní izolací do tmy/chladničky (5 °C). Chladové předpůsobení pozitivně ovlivňuje výtěžnost protoplastů na gram čerstvé hmoty. Nemí vhodné u kultivací na SH médiích. Sterilní *in vitro* rostliny (kromě *V. formosa*) jsou nejdříve krátce ošetřeny roztokem Tween (20 µl/100 ml sterilní destilované vody, 1–2 min) a ihned třikrát opláchnuty sterilní destilovanou vodou.

Příprava donorového pletiva

Z napěstovaných rostlin jsou odebírány pouze vrcholové listy a listy z nejmladšího nodu. Nelze odebírat listeny, listy starší a úponky. Se stářím rostlin se zvyšuje výtěžnost protoplastů z gramu čerstvé hmoty. Mladší rostliny jsou předpokladem k lepší regeneraci v protoplastové kultuře.

Koncentrace enzymů pro degradaci buněčných stěn

4% cellulase R10 + 3 % macerozyme R10 + 0,1% (0,2%) pectolyase Y-23 (Duchefa)

Doba působení enzymatického roztoku: 15–18 hod. Účinek je pozorován pod inverzním mikroskopem. Vlastní izolace je zahájena, když je patrné uvolňování protoplastů z rostlinného pletiva. Vlastní postup přípravy a izolace protoplastů; stanovení vitality protoplastů; stanovení a úprava hustoty protoplastů pomocí Bürkerovy komůrky:

<https://www.vubhb.cz/cs/metodika-fuze-protoplastu-elektrickym-polem>

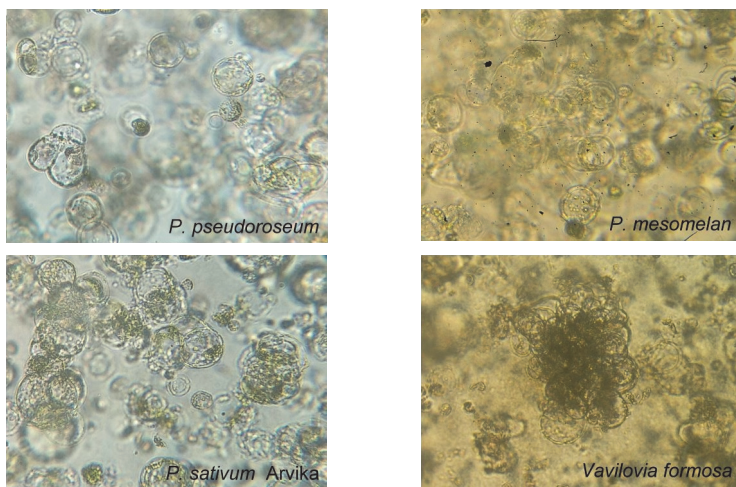
Z vypočteného celkového počtu protoplastů daného vzorku je spočítán výnos protoplastů na 1 gram čerstvé hmoty listového mezofylu.

4.2.4 Kultivace protoplastů

Požadovaná výsevová hustota je obvykle $1-5 \times 10^5$ protoplastů/ml. Protoplastová suspenze v roztoku W5 se krátce centrifuguje (3 min při 500 rpm). Pasteurovou pipetou se odstraní supernatant. Následně je přidáno kultivační médium s agarózou (1% roztok agarózy a tekuté médium ve dvojnásobné koncentraci jsou nejprve smíchány 1:1). Teplota média při míchání se suspenzí protoplastů je 37 °C.

Suspenze protoplastů v kultivačním médiu je Pasteurovou pipetou v jednotlivých kapkách nanášena na dno malých Petriho misek (ø 3,4 mm). Krátce na to dojde ke ztuhnutí kapek a ty pak jsou přelity tekutým kultivačním médiem dle uvedených kombinací (**Tabulka 1**). Petriho misky

jsou uzavřeny Parafilmem. Je zkontrolován stav protoplastů pod inverzním mikroskopem. Misky jsou řádně označeny a uloženy do termostatu (25 °C). V pravidelných intervalech je vyměňováno kultivační médium (2–4 dny) a sledován stupeň regenerace (**Obrázek 10**).



Obr. 10: Regenerace buněčných stěn, buněčné dělení a buněčné hrozny *Pisum* ssp. a *V. formosa*

Tab. 1: Kombinace perspektivních kultivačních médií a růstových regulátorů s dopadem na stupeň regenerace (BD – buněčné dělení; BK – buněčné kolonie; horní index = počet týdnů vitality protoplastové kultury)

růstové regulátory (mg/l)	kultivační médium										
	5 LP	7,5/1 LP	10/1 LP	6/1 LP	6/2 LP	6/3 LP	LP	LP_A	LP_B	KM	SW ₁₁
ZT	5	7,5	10	6	6	6				5	0,5
ZT-R		1	1	1	2	3	5				
PIC								0,2			
KIN								0,5			
2,4-D									1		0,2
2-iP									1		
NAA											2
<i>Pisum</i> ssp.	BD ²	BD ²	BD ²	BD ²	BD ²	BD ²	BD ²	BD ²	BD ³	BD ²	
<i>V. formosa</i>										BK ⁴	BK ⁴

4.2.5 Kontrola sterility použitých roztoků

Všechny roztoky jsou po použití zkontrolovány bakteriálním testem: 1 ml roztoku + 1 ml provokačního média Standard I nutrient broth. Po 3–4 dnech kultivace ve tmě při 25 °C je kontrolována přítomnost infekce (mléčné zbarvení roztoku). Enzymy a růstové regulátory jsou přidávány do médií filtrací – předfiltr 0,45 µm/filtr 0,22 µm, pH je upraveno na 5,8 a je nezbytné zkontrolovat koncentraci enzymů v originálním balení a navážku případně přepočíst na 1U, sterilizace autoklávováním 121 °C po dobu 20 min; vybrané růstové regulátory jsou filtrovány.

4.2.6 Složení roztoků/kultivačních médií

Standard I nutrient broth	25 g/l			
pH 7,5; sterilizace autoklávováním 121 °C/15 min				
Schenk & Hildebrand	g/l	A	B	C
SH médium (Duchefa)	3,2	✓	✓	✓
vitaminy SH (Duchefa)	1,01	✓	✓	✓
sacharóza	15	✓	✓	✓
Gelrit	3	✓	✓	✓
mg/l				
AgNO ₃	3	✓	✓	✓
Alar 85	1,5	✓	✓	✓
BAP	0,5			✓
	2		✓	
Quoirin & Lepoivre	g/l	G	F	
QL médium (Duchefa)	3,4	✓	✓	
sacharóza	20	✓	✓	
Gelrit	3	✓	✓	
mg/l				
BAP	0,5		✓	
Putrescine HCl	322	✓		
sterilizace autoklávováním 121 °C/20 min				
u médií s AgNO ₃ 114 °C/20 min				
pH 6 před sterilizací				

Enzymatický roztok	g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,735
MES	1,952
	M
myo-inositol	0,5/0.6**
	mg/l
NAA	5
ZT	2*
	g/l
Cellulase R10 (4%) (Duchefa)	40*
Macerozyme R10 (3%) (Duchefa)	30*
pectolyase Y23 (0,1 – 0,2 %) (Duchefa)	1–2*
sterilizace autoklávováním 121 °C/20 min	
* sterilizace filtrací, ** 0,5 M – <i>V. formosa</i> , 0,6 M – rod <i>Pisum</i> pH 6 před sterilizací	
promývací roztok W5	g/l
NaCl	9,0
KCl	0,8
CaCl ₂ .2 H ₂ O	18,4
Glukóza	1,0
Glycin	1,0
sacharóza 0,5 M	171,15 g/l
zásobní roztok FDA (zr)	0,005 g/1 ml acetonu
pracovní roztok FDA	20 µl zr/1 ml W5
agaróza (1%)	1g/100 ml
média ke kultivaci protoplastů	
KM (Kao a Michayluk 1975)	
LP (Lehminger-Mertens a Jacobsen 1989)	Tabulka 1
SW (Bříza a Machová 1991)	

4.2.7 Shrnutí

Uvedený metodický postup stanovuje podmínky kultivace donorových rostlin zástupců rodu *Pisum* a *V. formosa* pro účely protoplastových kultur, postup izolace protoplastů z listového mezofylu *in vitro* rostlin s výťažností protoplastů z gramu čerstvé hmoty u zástupců rodu *Pisum*

a *V. formosa* v hodnotách až 8×10^6 , v průměru 4×10^6 ; popisuje postup kultivace protoplastů v agarózových kapkách; představuje výchozí bod pro kultivace protoplastů k dosažení buněčného dělení/tvorby buněčných hroznů. Pro další rozvoj regeneračních procesů je vyžadováno precizní experimentální studium pro každý jednotlivý druh (celkové zobecnění není možné). Úskalím v problematice protoplastových kultur uvedených druhů je velká citlivost na stresové faktory v kterémkoli bodě procesu.

4.3 POUŽITÉ ZKRATKY

Alar 85 (syn.: succinic acid mono(2,2-dimethylhydrazide); Daminozide; $C_6H_{12}N_2O_3$)

BAP = 6-benzyl amino purine; syn. benzyladenine

FDA = fluorescein Diacetate

IBA = indole-3-butyric acid

KIN = kinetin

MES = 2 – (N- morpholino)ethanesulfonic acid)

MS = médium s vitaminy (Murashige a Skoog 1962)

NAA = naphthaleneacetic acid

PIC = picloram

QL = médium s vitaminy (Quoirin a Lepoivre 1977)

SH = médium s vitaminy (Schenk a Hildebrandt 1972)

ZT = zeatin

ZT-R = zeatin riboside

WPM = médium s vitaminy (Lloyd a McCown 1980)

2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

2-iP = 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena komerčním laboratořím, které se zabývají šlechtěním plodin. Naše poznatky využijí také výzkumná a vědecká pracoviště, která se zabývají problematikou indukované, přirozené polyploidizace a somatické hybridizace z hlediska morfologie a fyziologie rostlin. Metodika je rovněž určena pro laboratoře poskytující praktický výcvik vysokoškolským studentům v oboru biotechnologií.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při zavádění biotechnologických metod nelze ekonomické dopady a návratnost předem ekonomicky odhadnout. Lze očekávat přínos až v případě dosažení nového šlechtitelského materiálu nebo nové odrůdy, které budou mít vneseny žádané vlastnosti z planých druhů (např. odolnost) při zachování kvalitativních ukazatelů požadovaných pro komerční odrůdy. Nepřímým ekonomickým dopadem by měl být pozitivní vliv na životní prostředí.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akopian J, Sarukhanyan N, Gabrielyan I, Vanyan A, Mikić A et al. (2010) *Genet Resour Crop Evol* 57:1127–1134
- Assani A, Chabane D, Foroughi–Wehr B, Wenzel G (2006) *PCTOC* 85:257–264
- Bhadra SK, Hammatt N, Power JB, Davey MR (1994) *Plant Cell Rep* 14:175–179
- Böhmer P, Meyer B, Jacobsen HJ (1995) *Plant Cell Rep* 15:26–29
- Bříza J, Machová I (1991) *Biol Plant* 33:225–233
- Constabel F, Dudits D, Gamborg OL, Kao KN (1975) *Can J Bot* 53:2092–2095
- Constabel F, Weber G, Kirkpatrick JW, Pahl K (1976) *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* 79:1–7
- Dhooghe E, Denis S, Eeckhaut T, Reheul D, Van Labeke MC (2009) *Euphytica* 168:33–40
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck (2011) *PCTOC* 104: 359–373

- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Wiley–VCH Verlag, Weinheim
- Durieu P, Ochatt SJ (2000) *J Exp Bot* 51:1237–1242
- Gamborg OL, Shyluk JP, Shahin EA (1981) In *Plant Tissue Culture – Methods and applications in Agriculture* (ed. Thorpe TA). Academic Press INC, NY.
- Gatti I, Guindón F, Bermejo C, Espósito A, Cointry E (2016) *PCTOC* 127:543–559
- Geerts P, Druart P, Ochatt S, Baudoin, JP (2008) *Biotechnol Agron Soc Envir* 12:41–46
- Golubev AA (1990) *Bull Appl Bot, Genet Plant Breed* 135:67–75.
- Chauvin JE, Label A, Kermarrec MP (2005) *J Hortic Sci Biotech* 80:693–698
- Jia SR (1982) *Can J Bot* 60:2192–2196
- Kao KN, Michayluk MR (1975) *Planta* 126:105–110
- Larkin PJ (1976) *Planta* 128:213–216
- Lehminger–Mertens R, Jacobsen HJ (1989) *Plant Cell Rep* 8:379–382
- Li XB, Xu ZH, Wei ZM (1995) *Plant Cell Rep* 15:282–286
- Lloyd G, McCown B (1980) *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 30:421–427
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996) *Nature* 379:66–69
- Menczel L, Nagy F, Kiss ZR, Maliga P (1981) *Theor Appl Genet* 59:191–195
- Mikić A, Smýkal P, Kenicer G, Vishnyakova M, Akopian J et al. (2009) *Pisum Genetics* 41:34–39.
- Mikić AM, Smýkal P, Kenicer GJ, Vishnyakova MA, Sarukhanyan NG et al. (2013) *Bot J Linn Soc* 172:524–531.
- Mikić A, Smýkal P, Kenicer G, Vishnyakova M, Sarukhanyan N et al. (2014) *Planta* 240:1139–1147.
- Murashige T, Skoog F (1962) *Physiol Plant* 15:473–497

- Ochatt S, Conreux C, Smýkalová I, Smýkal P, Mikić A (2016) PCTOC 127:637–648
- Ochatt SJ, Mousset–Déclas C, Rancillac M (2000) Plant Sci 156:177–183
- Pang ECK, Croser JS, Imberger KT, McCutchan JS, Taylor PWJ (2000) (Ed. Knight R): Cur Plant Scie and Biot in Agric 34:429–436
- Pratap A, Prajapati U, Singh CM, Gupta S, Rathore M et al. (2018) Plant Breed 137:235–249
- Puonti–Kaerlas J, Eriksson T (1988) Plant Cell Rep 7:242–245
- Quoirin M, Lepoivre P (1977) Acta Hortic 78:437–442
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2016) Planta 243:281–296.
- Schaefer H, Hechenleitner P, Santos–Guerra A, de Sequeira MM, Pennington RT et al. (2012) BMC Evol Biol 12:250.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Can. J. Bot. 50:199–204
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn T.C (1995) Proc Natl ATCCad Sci USA 92:7719–7723.
- Suda J (2005) Živa 1/2005:46–48
- Tamayo–Ordóñez MC, Espinosa–Barrera LA, Tamayo–Ordóñez YJ, Ayil–Gutiérrez B, Sánchez–Teyer LF (2016) Euphytica 209:1–22.
- Vishnyakova M, Burlyaeva M, Akopian J, Murtazaliev R, Mikić A (2016) Genet Resour Crop Evol 63:1085–1102
- Zahradnický slovník naučný. 2., Č–H. (1996) Praha (ÚZPI) 544 s. 1. vyd.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Smýkalová I, Šedivá J, Greplová M (2019) Biotechnological and breeding practices applied to wild pea species, including *Vavilovia formosa*, to obtain new breeding materials. 3rd Agriculture and Climate Change Conference, 24–26 March 2019, Budapest Hungary, Book of Abstract, P103.
- Šedivá J, Greplová M, Smýkalová I (2018) Creation of new genotypes of peas with the use of wild species and biotechnological methods. 14th Quadrennial Congress of the International Association of Plant

Biotechnology (IAPB), 19-24 August 2018, Dublin, Ireland. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54: S62–S63, P – 209.

Šedivá J, Greplová M (2019) Artificially induced polyploidization in *Anemone sylvestris* L. and *Vavilovia formosa*. International conference on Plant Science Technology & Molecular Biology, 23–25 May 2019, Valencia, Spain. Book of Abstracts: 19.

9 DEDIKACE

Metodika byla zpracovaná v rámci projektu TH03030050 Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod. (Technologická agentura České republiky).

ISBN 978-80-87674-34-5



9 788087 674345 >