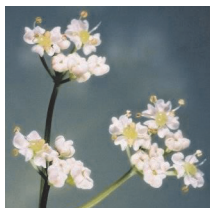


AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.
Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk



**Metodika
prašnické kultury
u kmínu kořenného (*Carum carvi* L.)**



Autorský kolektiv
Ing. Iva Smýkalová, Ph.D., Ing. Prokop Šmirous, Ph.D.,
Mgr. Jiří Horáček, Ph.D., RNDr. Miroslav Griga, CSc.

2015

Metodika prašnickové kultury u kmínu kořeného (*Carum carvi* L.)

Certifikovaná metodika byla vypracována s podporou grantu TAČR,
č. TA04020547.

Autoři:

Iva Smýkalová (smykalova@agritec.cz)

Prokop Šmirous (prokop@agritec.cz)

Jiří Horáček (horacek@agritec.cz)

Miroslav Griga (griga@agritec.cz)

Oponenti:

RNDr. Aleš Soukup, Ph.D. (ales.soukup@natur.cuni.cz)

Katedra fyziologie rostlin PřF UK v Praze Viničná 5, Praha 2, 128 00.

Vydal: AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, 2015.

1. vydání.

www.agritec.cz

© AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Šumperk 2015

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 osobu uvedenou výše.

ISBN 978-80-87360-42-2

OBSAH

1	ÚVOD	4
1.1	Cíl metodiky	5
1.2	Srovnání novosti postupů	5
1.3	Dedikace	6
1.4	Popis uplatnění Certifikované metodiky	6
1.5	Ekonomické aspekty	6
2	POPIS	7
2.1	Tvorba donorového materiálu	7
2.2	Založení prašnickových kultur	8
2.2.1	Zásady práce ve sterilních podmínkách	8
2.2.2	Sterilizace poupat kmínu kořenného	9
2.2.3	Izolace prašníků, prašnickové kultury a indukce embryogeneze ...	9
2.3	Regenerace kompletních rostlin	11
2.4	Determinace ploidie regenerantů	12
2.5	Determinace původu regenerantů	14
2.6	Indukovaná diploidizace a tvorba dihaploidního potomstva	15
3	Seznam použité související literatury	16
4	Seznam publikací, které předcházely metodice	17
5	Přílohy	18

1 ÚVOD

Kmín kořený (*Carum carvi* L., $2n = 20$) je tradiční převážně cizosprašná fakultativně dvouletá plodina ceněná pro její nutriční a farmaceuticky využitelné látky obsažené především v semenech (nažkách). U cizosprašných rostlin, které mají vyvinuté různé zábrany pro opylení vlastním pylem, není jednoduché získat homozygotní potomstvo vzhledem k projevu inbrední deprese (inzucht vlivem příbuzenského sprašování). Mohou se přitom projevit recesivní, letální geny. Mechanismy cizosprašnosti (heterogamie) u kmínu jsou známé (Németh 1998). Převažující cizosprašnost u kmínu (60–70%) může být příčinou nízké úrovně cílené dihaploidizace. V konvenčním procesu polního šlechtění trvá proces homozygotizace několik let (7–10 let), aplikací metod *in vitro* se zkracuje tento proces na 2–4 roky. Produkce dihaploidů je jednou z alternativních (vzhledem ke konvenčním polním metodám) a velmi užitečných metod pro šlechtitelskou praxi. Biotechnologie aplikovaná na tuto plodinu se pomalu rozvíjí, nicméně představuje velký potenciál.

V rámci projektu MZe č. QF4056 (2004–2007) se na našem pracovišti ověřila nejen možnost indukce haploidních jedinců cestou indukované androgenetické embryogeneze, ale také se dosáhlo obecně zavedení kmínu kořeného do kultur *in vitro*. Ačkoliv úroveň indukce je stále považována za velmi nízkou, byla stanovena u celého souboru použitých donorových rostlin, genotypově odlišných (Smýkalová a kol. 2009, 2012). Z tohoto pohledu je možné předpokládat aplikaci vyvíjené metodiky na širším spektru šlechtitelského materiálu. V porovnání s protokoly pro tvorbu dihaploidů u jiných plodin, např. pro řepku ozimou i na našem pracovišti (Smýkalová a kol. 2006), které jsou úspěšně aplikovány v praxi, není tento biotechnologický postup u kmínu nikde využit. Optimalizace metodiky je dlouhodobý proces, který vyžaduje rozsáhlou experimentální práci k ověření možnosti metodiku aplikovat ve šlechtitelské praxi. Platí totiž, že indukční podmínky jsou specifické nejen pro rostlinný druh, ale také pro určitý genotyp (Palmer a kol. 2005).

Používání klasických standardů cytokininů mnohdy brání dosažení vyšší responsivity *in vitro*. BAP (6-benzylaminopurin) je dosud nejrozšířeněji používaným cytokininem v rostlinných biotechnologiích, je rutinně komerčně užívaný pro své efektivní stimulační schopnosti v technikách mikropropagace. Důvodem je rychlá vstřebatelnost, zároveň však dochází ke stresové odezvě na příliš vysokou hladinu volných bází BAPu a dochází ke spuštění degradačních a deaktivčních mechanismů, které vedou k hromadění toxických katabolitů a endogenní koncentrace aktivních cytokininů významně poklesne. Je známo, že

BAP může i negativně ovlivnit růst, zakořeňování a aklimatizaci některých rostlinných druhů (Werbrouck a kol. 1996).

1.1 Cíl metodiky

Metodika je založená na *in vitro* postupu, kde výchozí kulturou k získání nového potomstva rostlin je prašnicková kultura. Aby byla metodika využitelná v praxi, je nutné vypracovat robustní postup, který by byl využitelný pro široké spektrum genotypů. Metodika pak umožňuje zavést prašnickové kultury do běžné šlechtitelské praxe. Prašnickové kultury představují složitou kulturu s ohledem na vývoj regenerantů z mikrospor. Podmínkou úspěšné metody je významný induktivní impuls k dosažení přechodu z generativního na vegetativní vývoj. V rámci těchto impulsů (indukčních faktorů) mohou hrát roli i nové deriváty cytokininů, aplikované v kultivačním mediu. Aplikací 9THP derivátů BAPu nebo meta-topolinů (nové deriváty cytokininů) dochází k regulaci metabolismu cytokininů směrem k postupnému uvolňování volných bází a zvýší se jejich využití v *in vitro* kultuře. Znalosti v oblasti působení nových derivátů cytokininů a jejich aplikace byly využity i při přípravě této metodiky.

1.2 Srovnání novosti postupů

V současnosti jsou u čeledi *Apiaceae* (miříkovité) k dispozici pouze velmi protichůdné protokoly (publikační výstupy), kterými lze dosáhnout regeneraci nových orgánů a kompletní rostliny. U kmínu byla popsána indukce somatické embryogeneze (SE) aplikací 3-indolylmáslé kyseliny (Furmanova a kol. 1984), vývoj SE v suspenzi lze ovlivnit aplikací kyseliny abscisové (ABA) (Ammirato 1993) a lze indukovat SE v hypokotylové kultuře BAP (Krens a kol. 1997). U velmi příbuzného kmínu římského (*Cuminum cyminum* L.) proliferace prýtlů (organogeneze) byla dosažena kombinací auxin a cytokinin, IAA a Kin (Shukla a kol. 1997), IAA a BAP (Hussein a Batra 1998) nebo pouze aplikací BAP (Tawfik a Noga 2001). Aplikace prašnickových/mikrosporových *in vitro* kultur u kmínu a produkce dihaploidů byly poprvé popsány teprve nedávno (Smýkalová a kol. 2009, Ferrie a kol. 2009) a jediný transformační protokol využívající k regeneraci somatická embrya (Krens a kol. 1997) svědčí o významném potenciálu pro biotechnologické aplikace u této plodiny. V současné době je také známo, že hydroxylované aromatické cytokininy (topoliny) jsou stabilnější, odolnější vůči degradačním enzymům a v některých mikropropagačních systémech aktivnější při nižších koncentracích ve srovnání s klasickými cytokininy (Werbrouck a kol. 1996, Strnad 1997). Topoliny navíc nebrzdí růst kořene, typický vedlejší negativní efekt při používání vysokých koncentrací BAP (Bairu a kol. 2009). Bylo tedy

ověřeno, že vývoj nových cytokininových derivátů má pro rostlinné biotechnologie velký praktický význam.

1.3 Dedikace

Metodika byla vypracována za přispění finančních zdrojů čerpaných z Technologické Agentury České Republiky v rámci projektu TA04020547 „*Progresivní biotechnologie na bázi nových syntetických derivátů cytokininů k získání dihaploidních linií kmínu, lnu a hrachu*“ (2014–2017).

1.4 Popis uplatnění Certifikované metodiky

Metodika je určena pro vlastní potřebu produkce dihaploidních linií, pro potřeby šlechtitelů, členů sdružení Český kmín a rovněž může sloužit jako obecná metodická příručka při zakládání prašnickových kultur pro jiné plodiny. Metodika je určena pracovištím, která se zabývají biotechnologickými postupy při šlechtění plodin.

1.5 Ekonomické aspekty

Jednou z podmínek užití ochranného označení „Český kmín“ je použití registrované odrůdy kmínu a certifikovaného osiva. Realizace metodiky pro prašnickové kultury a produkci dihaploidních linií přinese zejména pěstitelům kmínu kořenného jednak přímý finanční přínos, ale rovněž i úspory při pěstování a produkci nových šlechtitelských zdrojů. Dojde zejména k úspoře časových, materiálních a zejména finančních zdrojů u šlechtitelských organizací. Jeden rok šlechtitelské práce na kmínu představuje cca 1 mil. Kč, zjednodušením a zkrácením šlechtitelského procesu ze 7–10 let na 2–4 roky tak dojde ročně k úspoře cca 350 tis. Kč. Základní kalkulace pro pěstební plochu kmínu 3 500 ha jsou: výnos 1,0 t/ha, náklady na produkci kmínu 16–20 Kč/kg, realizační cena produkce 42 Kč/kg, cena osiva odrůdy 80 Kč/kg. Zisk při roční produkci 1 tuny osiva bude 220 tis. Kč. Náklady na pěstování nové odrůdy budou stejné jako při pěstování jiných odrůd (u ozimé nižší, kratší vegetační doba). Navýšení výnosu bude 5%, což při využití odrůdy na 20 % plochy kmínu dělá roční zisk 1,5 mil. Kč. Kmín je jednou z mála exportních zemědělských komodit. Vzhledem ke známé kvalitě českého kmínu předpokládáme navýšení exportu o 1 000 tun za 5 let, a to zejména do Holandska, Německa a Rakouska.

2 POPIS

Regenerace rostlin z prašníků u kmínu kořenného probíhá v následujících krocích (harmonogram):

1. tvorba donorového materiálu (5 měsíců),
2. založení prašnickových kultur (1–3 měsíce),
3. regenerace celistvých rostlin (1–2 měsíce),
4. determinace ploidie regenerantů (1 den),
5. determinace původu regenerantů (1 den),
6. indukovaná diploidizace a tvorba dihaploidního potomstva (5–7 měsíců).

2.1 Tvorba donorového materiálu

Příprava donorových rostlin kmínu kořenného (podmínky růstu, doba odběru z donorových rostlin) jsou důležitým krokem metodiky. Podmínky pro růst rostlin musí být přesně definované k dosažení kvalitní produkce květních orgánů a tvorby synchronizovaného vývoje pylových zrn uvnitř prašníků. Proto je vhodné donorové rostliny pěstovat v kontrolovaných podmínkách růstu, jako jsou fytkomory nebo růstové kabinety. Pro růst kmínu je vhodná 16h fotoperioda, teplota 19–23 °C. Za těchto podmínek dochází k rychlému růstu rostlin. Vzhledem k typu plodiny je ale nutné ve stadiu listových růžic (tloušťka listového krčku 7 mm) aplikovat jarovizaci – chlad (6 °C) po dobu 6 týdnů. Bez této fáze u ozimých nebo dvouletých odrůd nebo šlechtitelského materiálu nedochází k nasazení květních stvolů (generativní fáze). Po nasazení generativních orgánů je vhodné přepnout teplotní režim opět na vyšší teploty, 19 ± 1 °C. V příloze na **obrázku 1** je patrný vývojový stav donorových rostlin, ve kterém se přistoupilo k odběru květenství (složený okolík s nerozvinutými poupaty). Po celou dobu vegetace musí být dobrý zdravotní stav rostlin, ale je velmi vhodné nepoužívat žádné prostředky chemické ochrany, zejména v době květu a odběrů květenství. Na jedné donorové rostlině se může odběr aplikovat vícekrát, dle stavu květenství. K odběru se přistupuje přibližně v době, kdy hlavní okolík je nakvetlý. Po jeho odstranění dochází k proliferaci postranních okolíků, vhodné jsou okolíky vyšších řádů. Odběry probíhají v ranních hodinách odstřížením okolíků (2–3) do nádoby s vodovodní studenou vodou. Vzorky jsou přeneseny do chladu (4–6 °C), kde jsou uchovány až do doby jejich zpracování.

Postup:

- příprava nádob se substrátem;
- výsev osiva donorových rostlin do nádob (4 rostliny/Michelinovu nádobu);
- označení genotypů;
- pravidelné přihnojování (př. obch. název WUXAL super, AgroBio Opava);
- ve stadiu listových růžic přenos rostlin do jarovizace na 6 týdnů;
- označení jednotlivých donorových rostlin;
- ve stadiu tvorby generativních orgánů kontrola zdravotního stavu rostlin;
- odběr pupat ve stadiu vytvořených květních stvolů a nerozvinutých okolíků;
- uchování odebraného materiálu v chladu (4 °C) do doby explantace.

Materiál a pomůcky:

- osivo kmínu, genotypy (ozimý nebo dvouletý kmín kořený),
- pěstební Michelinovy nádoby (5–10 l),
- pěstební substrát,
- vícesložkové tekuté hnojivo (př. obch. název WUXAL super, AgroBio Opava),
- tyčky a šňůrky k podpoře větví,
- štítky k označení genotypů a donorových rostlin,
- klimatizovaná růstová komora (fotoperioda 16h, teplota 6 °C nebo 19 ±1 °C, intenzita osvětlení 80 μmol.m².s⁻¹),
- lednice (4–6 °C), tma.

2.2 Založení prašnickových kultur

2.2.1 Zásady práce ve sterilních podmínkách

Rostlinný materiál je zdrojem nejrůznějších patogenů, *in vitro* kultury vyžadují sterilní materiál, tzn. materiál bez přítomnosti bakteriální nebo houbové či dokonce virové kontaminace. Pro získání takového sterilního rostlinného materiálu je nutné dodržovat zásady práce ve sterilních podmínkách, zejména při manipulaci s rostlinným materiálem. Práce probíhá ve sterilních kabinetech (flowboxy), kde je zaručen sterilní provoz. Pracovník je oděn do bílého laboratorního oděvu a používá jednorázové chirurgické rukavice. Ve flowboxech se používají sterilní nástroje (pinzety, skalpely, nůžky nebo jehly), sterilní sklo a rovněž tepelný zdroj (lihové nebo plynové kahany) pro sterilizaci nástrojů, popřípadě hrdel kultivačních baněk. Sklo a nástroje jsou sterilizovány v horkovzdušné sušárně (105 °C, 1 h); sklo, plast, media, perlit a substrát či další pomůcky jsou sterilizovány autoklávováním (15 min, 121 °C, 120 kPa). Pro některé termolabilní složky medií (růstové regulátory, antibiotika) se sterilizace

provádí přímo ve flowboxu filtrací sterilní injekční stříkačkou přes jednorázové mikrofiltry (0,22 µm, Millipore, Carrigtwohill County Cork, Irsko). Pro povrchovou sterilizaci rostlinného materiálu se používají detergenty v kombinaci se smáčedly a sterilní destilovaná voda k oplachu zbytkových kapek detergentu. Rovněž při manipulaci s velmi malými objekty (prašníky, meristémy) je nutné pracovat ve flowboxu s binokulárním mikroskopem, který je řádně ořten lihem nebo jiným sterilizačním prostředkem. K přípravě kultivačního média se používají chemikálie v čistotě p.a. (produkty firem Duchefa, Sigma–Aldrich atd.). Při přípravě kultivačního média se používá destilovaná nebo deionizovaná voda. Agar nebo jiná gelující složka se v destilované vodě rozvaří v mikrovlnné troubě. Připravená media lze krátkodobě uskladnit v chladničce při teplotě 4 °C do doby jejich použití.

2.2.2 Sterilizace pupat kmínu kořenného

Celé(á) květenství (okolík) je (jsou) umístěno(a) v nádobce v chladu. Převod do sterilních podmínek zahrnuje přípravu roztoku detergentu (2% roztok hypochloridu sodného) s kapkou smáčedla (80% roztok Tween-20). V tomto roztoku jsou okolíky ponechány po dobu 2 minut, pak přeneseny pinzetou do 70% roztoku etanolu, kde jsou opět ponechány po dobu 2 minut, poté jsou okolíky přeneseny pinzetou do sterilní destilované vody. V ní dojde k oplachu a převodu okolíků do čisté sterilní vody, kde jsou ponechány po dobu 30 minut na třepačce při nízkých otáčkách (50 rpm). Oplach v následující sterilní vodě je zároveň prostředím, ze kterého se berou pupata k izolaci prašníků.

Materiál a pomůcky:

- květenství kmínu kořenného (2–3),
- kádinka s vodou na odebraná květenství,
- sterilní nádobky (3),
- sterilní destilovaná voda,
- sterilní pinzeta,
- kahan,
- horkovzdušná sušárna,
- vertikální třepačka.

2.2.3 Izolace prašníků, prašnickové kultury a indukce embryogeneze

Celé květenství je odebráno na Petriho misku, která je umístěna pod binokulárním mikroskopem. Zde dochází k izolaci prašníků s použitím dvou jehel nebo pinzety a jehly. V každém poupěti je 5 prašníků, jejich vývojové stadium (velikost) nemusí být vždy synchronní, proto musíme přistoupit i k výběru prašníků. Optimální velikost prašníku, kde se předpokládá vyšší responsivita, je cca

0,5 mm. Dle schopností pracovníka lze odizolovat až 1 000 prašníků za den. V případě kmínu kořenného jde o technicky náročnou práci.

K založení prašnickových kultur je nutné předem připravit medium, na kterém bude docházet k indukci embryí nebo embryogenních kalusů, tj. složení media bude vyvolávat cílenou změnu vývoje pylových zrn (mikrospor) směrem k somatickému vývoji. V příloze na **obrázku 2** jsou zachycena různá vývojová stadia pylových zrn, sledováno optickým mikroskopem a s použitím barviva (př. kapka 1% roztoku acetokarmínu). Je velmi vhodné stanovit korelaci mezi velikostí prašníků a převažujícím vývojovým stadiem pylových zrn. Přítomnost převažující pozdně jaderné fáze pylu v prašníku je dobrým předpokladem responsiveness v prašnickové kultuře kmínu kořenného. Zvrat normálního vývoje pylových zrn je energeticky náročný proces a vyžaduje i silný impuls, ke kterým v případě kmínu řadíme teplotní šok a vysoký obsah cukrů v mediu. Základní složení a příprava kultivačního media a specifické složky indukčního media pro prašnickové kultury kmínu kořenného jsou uvedeny v příloze (**Tabulky 1A, 2**). Izolované prašníky o vhodné velikosti jsou jehlou rozmístěny v řadách na povrch agarového indukčního media (50–80 prašníků na Petriho misku), řádně označeny (datum, genotyp, medium, eventuálně i aplikace indukční teploty) a přeneseny do chladu a tmy (6 °C). Po třech dnech kultivace v chladu a tmě jsou Petriho misky přeneseny do kultivační místnosti s vyšší teplotou (22 ±1 °C), tma je ponechána (tmavé boxy). Kultivace prašníků probíhá až do doby, kdy dochází k vytváření mikrokalusů nebo embryí (responsivní prašníky). Indukce může probíhat nejdéle 3 měsíce od založení prašnickových kultur a je genotypově závislá. Embrya nebo embryogenní kalusy jsou separovány z indukčních medií a dále pasážovány na regenerační media. Specifické složení regeneračního media uvádí **Tabulka 2**. Úspěšnou proliferaci embryí/embryogenních kalusů z prašníků je možné sledovat pod binokulárním mikroskopem a dále s použitím jiných technik, jakou je například fluorescenční mikroskopie. Obrazová dokumentace v příloze zachycuje vývoj embryí směrem k celistvým rostlinám (**obrázek 3**). Je zde uvedena možnost obou způsobů regenerace v prašnickových kulturách, tj. z mikrospor (haploidní jedinci, jednoduchá sada chromozomů, neschopnost produkce potomstva) nebo ze somatických buněk pletiva prašníku (diploidní jedinci, identická chromozomová sada s donorovou rostlinou, fertillní rostliny).

Postup:

- sterilizace poupat ve flowboxu,
- izolace prašníků,
- přenos na indukční medium,
- kultivace prašníků 1–3 měsíce,
- pasáž responzivních prašníků na regenerační nebo zakořeňovací medium.

Materiál a pomůcky:

- květenství kmínu kořeného (2–3),
- optický mikroskop, krycí a podložní skla,
- binokulární a cytologický mikroskop s osvětlením,
- sterilní Petriho misky,
- sterilní nádoba s lihem,
- sterilní jehly a pinzeta,
- indukční medium,
- popisovače,
- izolační páska (př. parafilm),
- lednice nebo chladicí box (4–6 °C),
- kultivační místnost (22 ±1 °C),
- tmavý box.

2.3 Regenerace kompletních rostlin

Celistvé dobře vyvinuté rostliny z *in vitro* podmínek na regeneračním mediu (zakořeňovací medium) jsou vyjmuty z kultivačních baněk, ve sterilních podmínkách jsou vysázeny do sterilního perlitu v Erlenmayerových baňkách (250ml) a zality tekutým mediem ½ MS (Murashige and Skoog 1962) bez růstových regulátorů a se sníženým obsahem cukrů (**Tabulka 1B**). Rostliny jsou ponechány v perlitu pro vytvoření dostatečné kořenové soustavy (14 dnů). Poté jsou rostliny převedeny do perlitu s aplikací kolchicinu (10µM roztok, 39,9 mg/100 ml destilované vody). Ve sterilních baňkách jsou rostliny umístěny do tmy na 24 h a pak na 24 h na světlo. Poté jsou rostliny vyjmuty a převedeny do perlitu již bez kolchicinu. Víčka jsou perforována a po 10 dnech kultivace v kultivační místnosti jsou rostliny vyjmuty a převedeny do *ex vitro* podmínek. Jedná se o aklimatizaci rostlin, kdy dochází k přestupu rostlin z *in vitro* (sterilních) do *ex vitro* (nesterilních) podmínek. Tento krok je kritický, zejména díky náchylnosti rostlin k houbovým patogenům a ztrátě vody v pletivech, do té doby plně saturovaných vodou a nefunkční vrstvou pokožkových pletiv v *in vitro* podmínkách. Z tohoto důvodu je doporučena aplikace fungicidních přípravků (Previcur, Bayer Crops Science). Rostliny jsou pravidelně kontrolovány a vlhčeny

rozprašovačem s destilovanou vodou. Při tomto kroku dochází téměř vždy ke ztrátám rostlin. Aklimatizace trvá 14 dnů a víka pařníků se mohou postupně otvírat. V případě vitálních a dobře zakořeněných rostlinek se může přistoupit k jejich přesazení do sterilního pěstebního substrátu a malých kontejnerů (**obrázek 4**). Pěstování rostlin probíhá za standardních růstových podmínek v nádobách. Používá se fytkomora nebo skleník. Ve stavu listových růžic se přistoupí k dalším analýzám.

Postup:

- izolace a pasáž vytvořených embryí nebo orgánů na regenerační (zakořeňovací) medium;
- kultivace regenerantů (1 měsíc);
- převod zakořeněných rostlinek do sterilního perlitu – vyjmutí pinzetou ze sterilních nádob, oplach sterilní destilovanou vodou (kolchicinace), zasazení do perlitu, zálivka ½ MS mediem, uzavření minipařníků;
- průběžné doplňování zálivky mediem a vlhčení rozprašovačem s destilovanou vodou;
- po 14 dnech kontrola průběhu aklimatizace, pootevření vík minipařníků;
- příprava kontejnerů se sterilním substrátem;
- po dalších 14 dnech převod dobře zakořeněných rostlin do sterilního substrátu v kontejneru, označení původu rostlin;
- přenos kontejnerů do fytkomory nebo skleníku;
- průběžné přihnojování.

Materiál a pomůcky:

- minipařníky (dostupné v zahradnických potřebách),
- pinzeta,
- sterilní perlit,
- oplachovací nádoba s destilovanou vodou,
- rozprašovač,
- kontejnery – průměr 5–10 cm,
- sterilní pěstební substrát,
- hnojivo (př. obch. název WUXAL super, AgroBio Opava),
- štítky na označení rostlin.

2.4 Determinace ploidity regenerantů

Způsobů jakými lze sledovat počet chromozomů a tím i úroveň ploidity u regenerantů je více, dle technického zázemí na pracovišti. Vedle stanovení počtu chromozomů v kořenové špičce (karyologická analýza) nebo počtu a velikosti

průduchů na listech (**obrázek 5**) je nejúčinnější metodou flow-cytometrie. Metoda je založena na stanovení ploidie (obsahu DNA) v jednotlivých buňkách. Touto metodou můžeme od sebe odlišit haploidní, diploidní i tetraploidní jedince ($x = n = 10$, $x = 2n = 20$, $x = 4n = 40$). Potřebujeme k tomu malý vzorek listů a kontrolní vzorek (standard) pro objektivitu měření, kde známe počet chromozomů (většinou donorová rostlina kmínu). Na **obrázku 6** je doložen rozdílný profil ploidie. Haploidní rostliny se vyznačují subtilní habitem, průduchy dosahují jen dvou třetin velikosti průduchů kontroly, po odkvětu se nezakládají nažky (semena). Nevýhodou je, že touto metodou nedokážeme od sebe rozpoznat původ regenerantů v případě výskytu spontánní diploidizace v průběhu regenerace z mikrospor od regenerace ze somatických pletiv prašníku. K tomuto odlišení nám může pomoci biochemické stanovení některých z izoenzymů.

Postup:

- odběr mladých listů (1–2) do uzavíratelných nádobek nebo plastických sáčků;
- odběr 20 mg z každého sáčku = vzorek;
- resuspendace a homogenizace vzorku (sekání vzorku ostrým skalpelem na Petriho misce) spolu se standardem v pufru OTTO I, tj. 0.1M kyselina citronová, 0,5% Tween-20 (Otto 1990);
- suspenze je filtrována přes nylonový filtr (40 μ m velikost otvorů);
- k filtrátu je přidána RNAáza (50 μ M) a roztok propidium jodidu (50 μ l) a pufr OTTO II tj. 0,4M Na₂HPO₄.12H₂O;
- suspenze je ponechána při pokojové teplotě po dobu 30 minut;
- poté je vzorek proměřen na flow-cytometru (př. PAS flow cytometer, Partec GmbH);
- měření píků fluorescence jader ve fázi G1: standard (diploid) je na pozici 100, přibližně 5 000 jader je měřeno v jednom vzorku.

Materiál a pomůcky:

- rostliny regenerantů,
- odběrové nádoby,
- nůžky,
- skalpel,
- Petriho miska,
- nylonový filtr, kádinka,
- flow-cytometer.

2.5 Determinace původu regenerantů

V případě kmínu kořenného máme možnost biochemického elektroforetického stanovení izoenzymů esterázy (EST, E.C.3.1.1.2.) pro odlišení původu regenerantů. Detekce izoenzymů je popsána v práci Vallejos a kol. (1983). Princip této metody spočívá v porovnání profilu proužků mezi donorovou rostlinou a skupinou rostlin získaných odběrem prašníků z této rostliny (**obrázek 7**). Pokud je profil shodný, jedná se o diploidní rostlinu vznikající regenerací somatických buněk prašníků. Pokud v profilu dojde k posunu nebo ztrátě některých bandů, můžeme rozpoznat haploidní nebo dihaploidní status a potvrdit původ rostliny z mikrospor (**obrázek 7B**). Je pravděpodobné, že embryogenní kalus může vzniknout jak z mikrospor (tvorba embryí) tak ze somatických buněk (tvorba pupenů).

Postup:

- donorové rostliny a rostliny regenerované z prašníků;
- odběr mladých listů do mikrozkuavek, předem označených, navážka vzorku 100 mg;
- homogenizace vzorku v pufru:
50mM Tris-HCl, 5mM 2-mercaptoetanol, 1mM EDTA, pH 7,4;
- vzorky zamrazeny přes noc ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- ke vzorkům přidáno 100 μl extrakčního pufru, tj. 25% glycerol, 0,01% bromofenolová modř;
- centrifugace vzorků 14 000 rpm ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$), 10 minut;
- příprava polyakrylamidového gelu – PAGE, 7,5% running gel pH 6,4 a 5% stacking gel pH 6,0, katodový pufr – Tris-Tricin (pH 7,1) a anodový pufr – Tris-acetate (pH 6,4);
- separace izoenzymů při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mA po dobu 4 h;
- stabilizovaný gel je acidicky obarven a zafixován, usušen a skenován;
- vyhodnocení pozice a počtu proužků na gelu.

Materiál a pomůcky:

- rostlinný materiál,
- mikrozkuavky,
- centrifuga,
- mrazicí lednice ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- sestava pro nativní diskontinuální vertikální elektroforézu,
- skener nebo fotoaparát.

2.6 Indukovaná diploidizace a tvorba dihaploidního potomstva

Další krok je zaměřen na získání fertálních dihaploidních rostlin v případě haploidních regenerantů. Rostliny ze sadbových kontejnerů jsou převedeny do větších nádob (5–10 l) a přihnojeny, po jarovizaci a ve fázi tvorby květních stvolů se přistoupí ke kolchicinaci (chemická indukce). Cílem je zdvojnásobit počet chromozomů a tím dosáhnout jejich fertálního stavu. Postupuje se přípravou 0,05% roztoku kolchicinu (rozpuštěný v DMSO), jeho aplikací na řeznou ránu stonku v blízkosti květenství (před úplným otevřením pupat na postranních větvích). Roztok kolchicinu a manipulace s ním vyžaduje rukavice. Existuje možnost aplikovat kolchicin do indukčního media nebo aplikovat ponoření rostlin do roztoku kolchicinu při převodu z perlitu do substrátu. Po 24 h indukčního působení ve tmě se nechají ošetřené květní stvoly dozrát do semenného stavu, probíhá v izolaci (papírový nebo textilní izolátor pylu). V případě úspěšné kolchicinace z haploidních rostlin získáme dihaploidní osivo. Působením kolchicinu mohou teoreticky vznikat i pletiva s vyšším stupněm ploidie nebo aneuploidní rostliny. Rostliny v nádobách jsou ponechány až do doby jejich zralosti, vyžalá semena jsou sklizena odděleně pro každou rostlinu, dihaploidní potomstvo (DH linie). Osivo je ponecháno v uzavřených sáčcích k plnému dozrání. Toto osivo je pak možné přímo použít do šlechtitelského procesu. Z ostatních rostlin můžeme získat osivo, které může být rovněž využito ve šlechtitelském procesu pro své nové šlechtitelské charakteristiky.

Postup indukované diploidizace:

- odřezání hlavního okolíku,
- na řeznou ránu aplikovat kapku roztoku kolchicinu,
- zabalit do alobalu,
- 24h působení,
- odstranění alobalu,
- izolace květenství,
- dopěstování rostlin,
- sklizeň osiva.

Materiál a pomůcky:

- papírové sáčky,
- popisovač,
- osivo DH linií.

3 Seznam použité související literatury

- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K.: Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151, 1968.
- ADAMUS A., MICHALIK B.: Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Folia Hort.* 15:49–58, 2003.
- AMMIRATO P.V.: Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. *Plant Physiol* 59:579–586, 1977.
- AMMIRATO P.V.: Embryogenesis. In: Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (eds): *Handbook of Plant Cell Culture, Techniques for Propagation and Breeding*, vol 1. MacMillan Publishing Company, New York, str.82–123, 1993.
- ANDERSEN S.B.: Anther culture in carrot. In: Bornman CH, Heneen WK, Jensen CJ, Lundquist A (eds) *Proc. 1st Nordic Cell Tissue Cult. Symp. Research, Breeding and Production of Crop Plants*. *Hereditas Suppl.* 3, str.132, 1985.
- ANDERSEN S.B., CHRISTIANSEN I., FARESTVEIT B.: Carrot (*Daucus carota* L.): *In vitro* production of haploids and field trails. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 12 Haploids in Crop Improvement I*, Springer-Verlag, Berlin, str.393–402, 1990.
- BAIRU M.W., N. JAIN W.A. STIRK K. DOLEŽAL K., J. VAN STADEN K.: Solving the problem of shoot– tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany.* 75:122–127, 2009.
- FERRIE A.M.R.: Current status of doubled haploids in medicinal plants. In: Touraev A. Forster B.P., Jain S.M. (eds): *Current status of doubled haploids in medicinal plants advances in haploid production in higher plants*. Springer, Berlin, Germany; Heidelberg, Germany; New York, NT, USA, str.209–217, 2009.
- FURMANOVA M., OLEDZKA H., SOWINSKA D.: Regeneration of plants by embryogenesis with callus cultures of *Carum carvi* L. *J. Plant. Physiol.* 115: 209–210, 1984.
- HUSSEIN M. A., BATRA A.: *In vitro* embryogenesis of cumin hypocotyl segments. *Ad. Plant. Sci* 11:125–127, 1998.
- KRENS F.A., KEIZER L.C., CAPEL I.E.M.: Transgenic caraway, *Carum carvi* L.: a model species for metabolic engineering. *Plant Cell Rep.* 17:39–43, 1997.
- NÉMETH, E.: *Caraway. The Genus Carum*. Harwood Academic Publishing, Amsterdam, 1998.

- MURASHIGE T., SKOOG F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobaccotissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473, 1962.
- OTTO F.: DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H.A., Darzynkiewicz Z. (eds.): *Methods in Cell Biology*, vol 33. Academic Press, Inc., New York, str.105–110, 1990.
- PALMER C.E., KELLER W.A., KASHA K.J.: *Biotechnology in agriculture and forestry. Haploids in crop improvement.* vol 56. Springer, Berlin, Germany; Heidelberg, Germany; New York, NY, USA, 2005.
- SHUKLA M.R. SUBHASH N., PATEL D.R., PATEL S.A.: *In vitro* studies in cumin (*Cuminum cyminum* L.). In: Edison S., Ramana K.V., Sasikumar B., Nirmal B.K., Eapen S.J. (eds): *Biotechnology of Spices, Medicinal and Aromatic Plants.* Indian Society for Spices, Calicut, str.45–48, 1997.
- STRNAD M.: The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* 101:674–688, 1997.
- TAWFIK A.A., NOGA G.: Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 66:141–147; 2001.
- VALLEJOS C. E.: Enzyme activity staining. In: Tanksley S. D., Orton T. J. (eds): *Isozymes in plant genetic and breeding, part A.* Elsevier, Amsterdam, The Netherlands; Oxford, England; New York, NT, USA: 469–516, 1983.
- WERBROUCK S.P.O., STRNAD M., VAN ONCKELEN H.A., DEBERGH P.C.: Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol. Plant*, 98: 291–297, 1996.

4 Seznam publikací, které předcházely metodice

- SMÝKALOVÁ I., VĚTROVCOVÁ M., KLÍMA M., MACHÁČKOVÁ I., GRIGA M.: Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in the breeding project „Czech Winter Rape“. – *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 42:58–71, 2006.
- SMÝKALOVÁ I., ŠMIROUS P. jr., KUBOŠIOVÁ M., GASMANOVÁ N., GRIGA M.: Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). *Acta Plant Physiol*, 31: 21–31, 2009.
- SMÝKALOVÁ I., HORÁČEK J., KUBOŠIOVÁ M., ŠMIROUS P. jr., SOUKUP A., GASMANOVÁ N., GRIGA M.: Induction conditions for somatic and microspore-derived structures and detection of haploid status by isozyme analysis in anther culture of caraway (*Carum carvi* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 48:30–39, 2012.

5 Přílohy

Tabulka 1A: Základní složení medií. B5 medium Gamborg a kol. (1968) – makro- a mikroprvky, vitamíny. Postupně přidávání komponent je dle sledu uvedeného v tabulce. Ostatní složky indukčního media jsou aplikovány dle typu media (Tabulka 2).

Makroelementy	mg/1 l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
CaCl ₂	113,23	2,265	Všechny komponenty postupně navažovat do kádinky, a rozpouštět v destilované vodě, do konečného objemu 1 l; aplikace 50 ml
KNO ₃	2500	50	
MgSO ₄	121,56	2,431	
NaH ₂ PO ₄	130,44	2,609	
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	2,680	
Mikroelementy	mg/1 l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
Roztok železa			
Na ₂ EDTA	36,70	7,45	Rozpustit zvlášť, smíchat a zahřát až roztok zežloutne; aplikace 5 ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O		5,57	
Roztok A			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	2,5 mg	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 1 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,5 mg	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	25 mg	
KI	0,75	75 mg	
Roztok B			
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	100	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 10 ml
H ₃ BO ₃	3	30	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	20	
Vitamíny	mg/1 l media	zásobní roztok mg/l	příprava; odpipetovaný objem
nikotinová kys.	1	10	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 10 ml
pyridoxin HCl	1	10	
tiamin HCl	10	100	
Ostatní složky	na 1 l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
myo-inozitol	100 mg/l	Přímá navážka, rozpustit v 5 ml destilované vody a přidat k ostatním složkám media	
glutamin	500 mg/l		
serin	100 mg/l		
maltóza	Viz předpis níže	Přímá navážka cukrů do kádinky, přidání objemů roztoků makro, mikro a vitamínů; do kádinky magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchače do úplného rozpuštění	
sacharóza	Viz předpis níže		
pH	5,8–6,0	Měření a úprava pH (za stálého míchání)	
Agar	5,5 g/l	Přímá navážka, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit	

Tabulka 1B: Tekuté ½ MS medium (Murashige and Skoog, 1962) – makro- a mikroprvky, vitamíny. Postupně přidávání komponent je dle sledu uvedeného v tabulce.

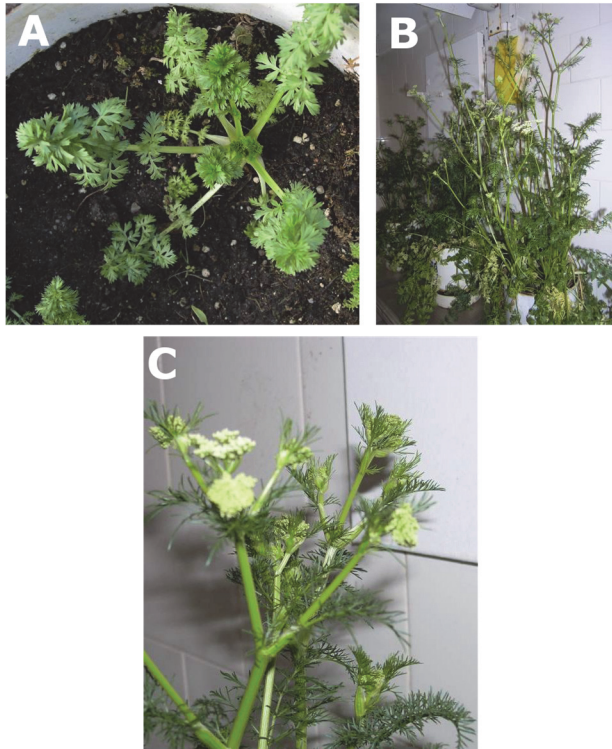
Makroelementy	mg/1 l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
CaCl ₂	332,02	6,64	Všechny komponenty postupně navažovat do kádinky, a rozpouštět v destilované vodě, do konečného objemu 1 l; aplikace 25 ml
KNO ₃	1900,00	38	
MgSO ₄	180,54	3,61	
KH ₂ PO ₄	170,00	3,4	
NH ₄ NO ₃	1 650,00	33	
Mikroelementy	mg/1l media	zásobní roztok g/l	příprava; odpipetovaný objem
Roztok železa			
Na ₂ EDTA	37,25	7,45	Rozpustit zvlášť, smíchat a zahřát až roztok zežloutne; aplikace 2,5 ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,85	5,57	
Roztok A			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	2,5 mg	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 0,5 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,5 mg	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	25 mg	
KI	0,83	83 mg	
Roztok B			
H ₃ BO ₃	6,20	62 mg	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 5 ml
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90	169 mg	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	86 mg	
Vitamíny	mg/1 l media	zásobní roztok mg/l	příprava; odpipetovaný objem
nikotinová kys.	0,50	5	Navážit a postupně přidávat do destilované vody, celkový objem 100 ml; aplikace 5 ml
pyridoxin HCl	0,50	5	
glycin	2,00	20	
tiamin HCl	0,10	1	
pH	5,8–6,0	měření a úprava pH (za stálého míchání)	

Tabulka 2: Specifické složení indukčního a regeneračního media. Auxiny: NAA – naftalen-1-octová kyselina, 2,4-D – 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (rozpuštěnost v čistém etanolu a teplé vodě); Cytokininů a jejich derivátů: BAP – 6-benzylaminopurin (rozpuštěnost v NaOH, KOH), mT – meta-topolin, BAP9THP – 6-benzylaminopurin-9-glukosid (rozpuštěnost v DMSO nebo v čistém etanolu). Růstové regulátory jsou přidány do media filtrací. Zásobní roztoky růstových regulátorů jsou připraveny jako 100 μ M.

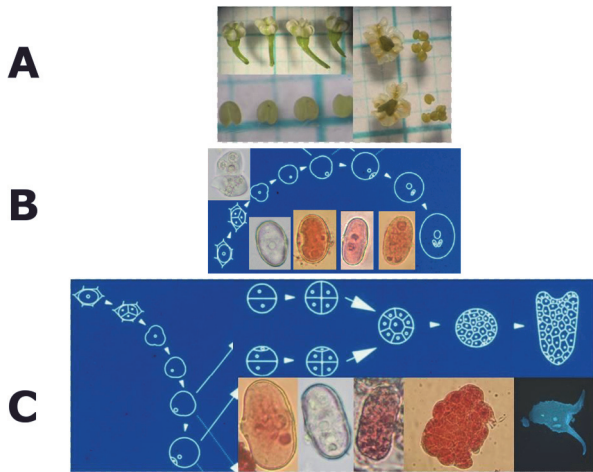
Typ indukčního media	cukr	auxin	cytokinin (derivát)
D1	2% sacharóza	0,25 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP
D7	6% sacharóza, 2% maltóza	0,1 mg/l 2,4-D 0,1 mg/l NAA	–
D16	2% sacharóza, 6% maltóza	0,25 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP
D17	9% maltóza	0,25 mg/l NAA	0,62 mg/l mT
D18	9% maltóza	0,1 mg/l 2,4-D 0,1 mg/l NAA	–
D19	9% maltóza	–	–
D20	9% maltóza	0,25 mg/l NAA	0,5 mg/l BAP9THP
Typ regeneračního media	Základní složení	cukr	auxin
R1	B5	2% sacharóza	–
R2	½ B5	1% sacharóza	–
R3	B5	1% sacharóza	–
R4	B5	1% sacharóza	0,01 mg/l NAA

Příprava acetokarmínového barviva:

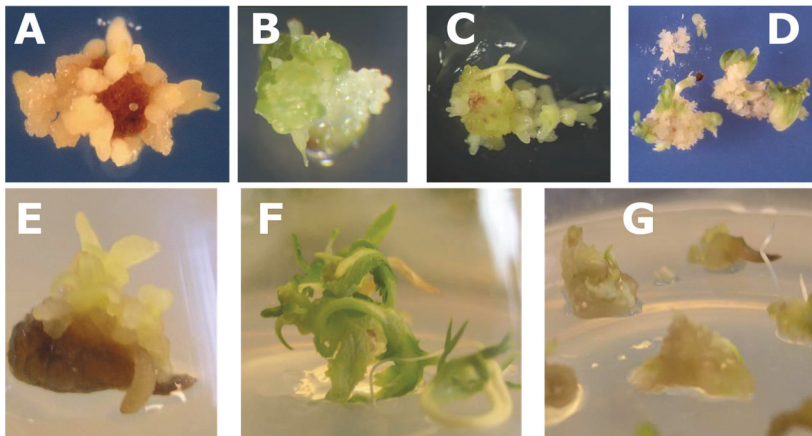
1–2 g karmínu rozpustit ve 100 ml 45% octové kyseliny a na mírném ohni se vaří asi ½ hodiny. Pro vaření používáme Erlenmayerovy baňky s úzkým hrdlem, po ochlazení roztok přefiltrujeme. Aplikace: prohrátí nad plamenem a 10–20 min při pokojové teplotě, aby se chromozómy dokonale probarvily, chromozómy červenofialové a cytoplasma slabě růžová.



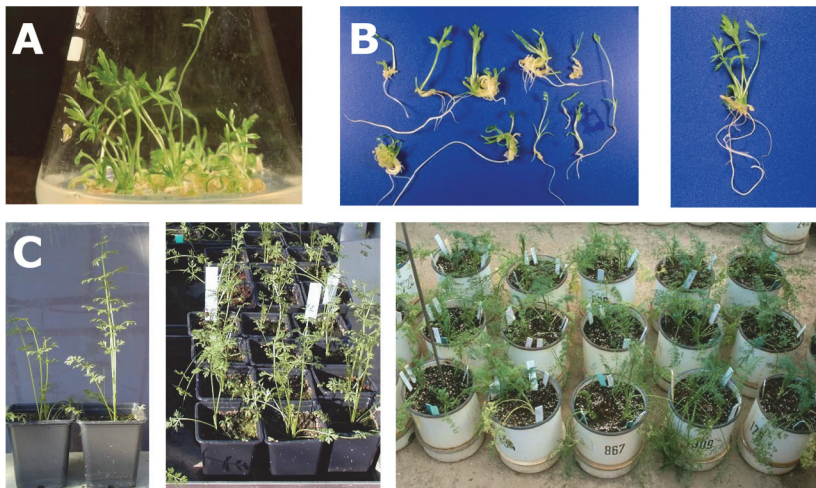
Obrázek 1: Vývojový stav donorových rostlin. Fáze listové růžice (kořenový krček 7 mm) – aplikace jarovizace (A); vytvoření květních stvolů – začátek odběru poutat (B); květenství – odběr neotevřených poutat, odběr celého okolíku (C).



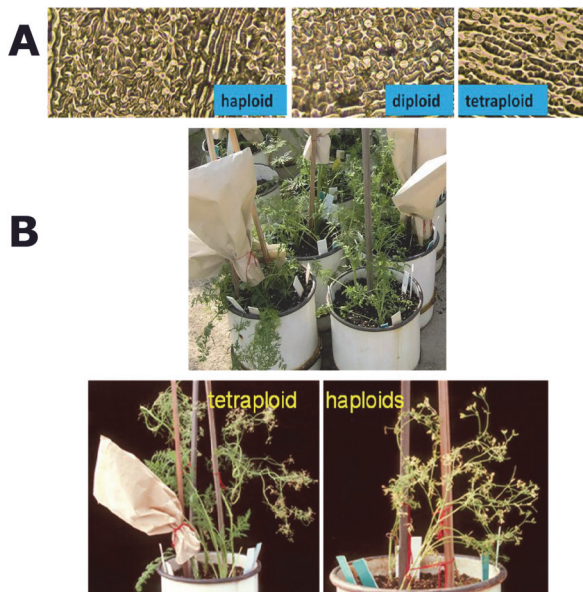
Obrázek 2: Velikost poutat a izolace prašníků (A). Vývojová stadia pylových zrn, sledováno optickým mikroskopem a s použitím barviva (př. kapka 1% roztoku acetokarmínu). Podélná velikost pylového zrna je v průměru 26 μm . Ne-embryogenní vývoj pylu (B) – tetráda, jednojaderné pylové zrno, dvoujaderné (1 vegetativní a 1 generativní jádro) a tříjaderné pylové zrno (1 generativní a 2 vegetativní jádra). Embryogenní vývoj pylu (C).



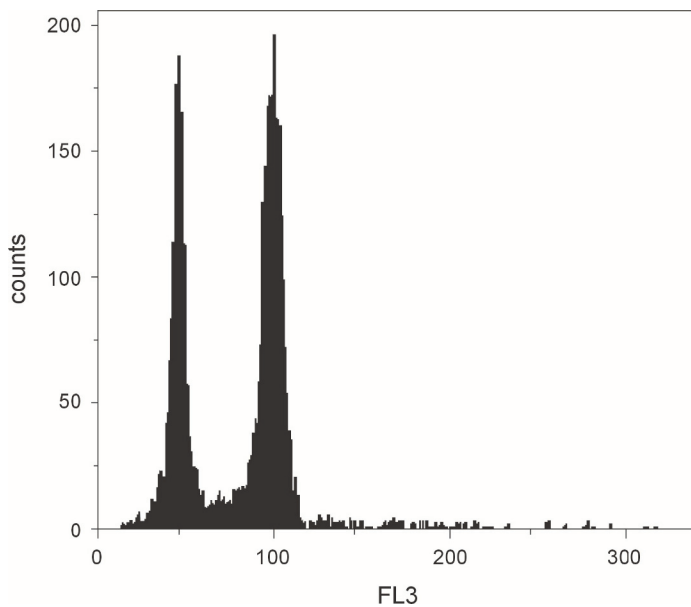
Obrázek 3: Vývoj embryí směrem k celistvým rostlinám. Regenerace v prašníkových kulturách, mikrosporová embryogeneze, původ v mikrosporách (A–D), sekundární somatická embryogeneze (E–G).



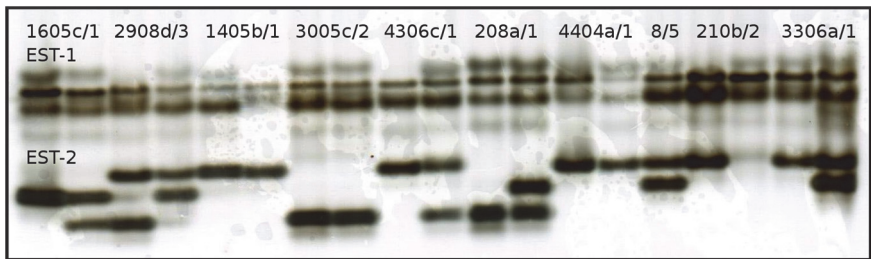
Obrázek 4: Regenerace *in vitro* rostlin (A), izolace jednotlivých zakořeněných rostlin (B), v případě haploidních rostlin kolchicinace, indukovaná diploidizace, převod rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek pěstování rostlin kmínu v sadbovácích a Mitscherlinových nádobách (C).



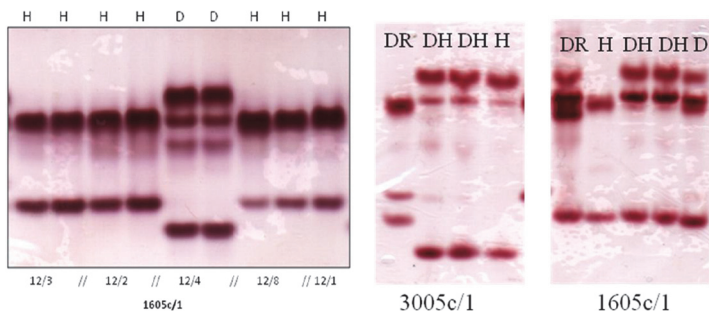
Obrázek 5: Počet a velikost průduchů na listech, rozdíly sledované vlivem různého stupně ploidy (A). Dopěstování do semenného stavu – dozrávání semen v izolaci, rozdílný habitus haploidních a tetraploidních rostlin odvozených z prašnickových kultur (B).



Obrázek 6: Rozdílný profil ploidie – determinace haploidního a diploidního jedince ($x = n = 10$, $x = 2n = 20$), pozice píku 50 a 100.



Obrázek 7A: Porovnání EST profilu proužků mezi donorovou rostlinou a skupinou rostlin získaných odběrem prašníků z této rostliny. Jen izoenzymy s heterozygotním profilem lze použít k odlišování, v případě kmínu jsou to esterázy. Každá donorová rostlina má svůj specifický profil, je tedy nutné udělat profil pro donorovou rostlinu ještě před odběrem okolíků. U kmínu jsou zřejmé dva typy esteráz v heterozygotním stavu, pokud se objeví dva a více proužků. To jsou základní předpoklady pro odlišování a detekci diploidů a dihaploidů u regenerantů z prašníkových kultur pomocí biochemických markerů. Detekci lze provádět na různých typech pletiv: nezralé embryo, staré listy, hypokotyly, embrya, kalus.



Obrázek 7B: V případě absence alespoň jednoho proužku v profilu regenerantů se bude jednat o vývoj z mikrospor. Profil donorové rostliny (první zleva) je na obrázku 7A. V případě genotypu 1605c/1 je možné pozorovat současně oba typy regenerace, z jednoho prašníku (12) vzniká haploidní (H - kalus označený 12/2, 12/8 a embryogenní kalus označený 12/1, 12/3) i somatický kalus (D - kalus označený jako 12/4). C. Pokud byla stanovena ploidie i u donorových rostlin (DR), lze rozeznat v potomstvu regenerovaných rostlin haploidní jedince $x = n = 10$ (H), u diploidních jedinců ještě původ z mikrospor (DH) jak je tomu v případě genotypů 3005c/1 nebo ze somatických buněk prašníku (D) v případě genotypu 1605c/1.

ISBN 978-80-87360-42-2



9 788087 360422