



Metodika prašnickové kultury lnu setého s aplikací nových syntetických derivátů cytokininů



Autorský kolektiv:
Ing. Miroslava Vrbová, Ph.D.
Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Metodika prašnickové kultury lnu setého s aplikací nových syntetických derivátů cytoki- ninů

Certifikovaná metodika byla vypracována s podporou grantu TAČR,
č. TA 04020547 a RO1016

Autoři:

Ing. Miroslava Vrbová, Ph.D.

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Oponenti:

RNDr. Hana Konrádová, Ph.D. (hana.konadova@natur.cuni.cz)

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univer-
zity Karlovy

Ing. Rostislav Václav Němejc, Ph.D. (Rostislav.Nemejc@ukzuz.cz)

Pracoviště kontroly přípravků na ochranu rostlin, ÚKZUZ, 4. května
287, Vsetín 755 01

Vydal: Agritec Plant Research, s.r.o.

v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk,
2017

1. vydání

<http://www.agritec.cz>

© AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, 2017

*Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovává-
na 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 obracíte písemně na osobu uvedenou výše.*

ISBN 978-80-87360-56-9 [PDF]

OBSAH

1	Úvod	4
1.1	Cíl metodiky	4
1.2	Srovnání novosti postupů.....	4
1.3	Dedikace	5
1.4	Popis uplatnění Certifikované metodiky	5
1.5	Ekonomické aspekty	6
2	Popis	6
2.1	Tvorba donorového materiálu.....	6
2.2	Založení prašnickových kultur	7
2.2.1	Zásady práce ve sterilních podmínkách.....	7
2.2.2	Izolace a sterilizace poupat lnu.....	7
2.2.3	Izolace prašníků, prašnickové kultury a indukce kalogeneze	7
2.3	Aplikace regulátorů metabolismu cytokininů, regenerace pupenů	8
2.4	Dlouhodobá kultura mnohonásobných prýtů	8
2.5	Regenerace kompletních rostlin.....	9
2.6	Determinace ploidie regenerantů	9
2.7	Indukovaná diploidizace a tvorba dihaploidního potomstva.....	9
3	Seznam použité literatury	11
4	Seznam publikací, které předcházely metodice	11
5	Přílohy	12

1 Úvod

Len setý je jednoletá, dvouděložná, samosprašná rostlina. Jedná se o velmi starou kulturní plodinu (pěstován již ve starověkém Egyptě před 10 000 lety), která má mnoho forem a je rozšířena téměř na všech kontinentech v různých klimatických a půdních podmínkách. Len (*Linum usitatissimum* L.) má tři technologické typy: prádňý len (využití na vlákno), olejný len (pěstovaný pro získání oleje) a přechodný olejnoprádňý len (dvojí možnost využití). Botanický název lnu vyjadřuje jeho mnohostranné využití (*usitatissimum* = nejužitečnější) – prakticky celá nadzemní biomasa může být komplexně zpracována na průmyslové, farmaceutické nebo potravinářské produkty.

V rámci šlechtění lnu setého jsou používány především klasické postupy získávání nových odrůd, jako je křížení a následná selekce. Alternativní metodou ke klasickému postupu – opakovaným selekcím je odstraňování genetické variability ve šlechtitelském materiálu pomocí prašnickové kultury. V konvenčním procesu šlechtění lnu trvá šest až osm let k získání inbredních linií, které jsou homozygotní. Vznik dihaploidních jedinců však umožňuje produkci zcela homozygotní materiálu za méně než rok a tím urychluje proces šlechtění. Prašnicková kultura je v současné době nejúspěšnější způsob získání dihaploidních linií, ovšem celková účinnost regenerace rostlin lnu je velmi nízká.

V rámci projektu TA04020547 byly použity v zavedeném postupu prašnickové kultury lnu nové syntetické deriváty cytokininů. Aplikací nových derivátů nebo inhibitorů degradace cytokininů byla v minulosti vyřešena, respektive překlenuta tzv. rekalcitrantnost některých odrůd, a to tak že došlo ke zlepšení regeneračních schopností nebo kvalitativnímu vylepšení regenerantů produkovaných určitým typem *in vitro* kultury

1.1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je inovace již zavedeného postupu při tvorbě úplně homozygotních linií lnu cestou regenerace rostlin z haploidních mikrospor v prašnickové kultuře. Při použití klasických růstových regulátorů je procento regenerovaných prýtů z prašníků velmi nízké, 2–3 % (Rutkowska-Krause, 1995). Díky aplikaci derivátů cytokininů do media se zvýšilo procento získaných prýtů i u odrůd jevících se jako rekalcitrantní v *in vitro* podmínkách (graf č.1, Přílohy). Vypracování metodiky s aplikací derivátů růstových regulátorů tedy umožní zavést metodu prašnickové kultury do praxe s větším důrazem na možnost získání nové odrůdy.

1.2 Srovnání novosti postupů

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je jednoletá převážně samosprašná rostlina. Klasický postup, který je dosud při šlechtění lnu používán, zahrnuje křížení,

pozitivní a negativní selekce. Vyšlechtění nové odrůdy trvá 17–24 let (Poliakov et al., 1995), neboť po rozšíření genetické variability křížením následuje selekce jedinců s požadovanými kombinacemi vlastností a ustálení šlechtitelského materiálu (odstranění variability) i v dalších sledovaných znacích, které celý šlechtitelský cyklus podstatně prodlužuje. Jestliže byly při počátečním křížení použity jako rodiče genotypy morfologicky podobné, může trvat vyšlechtění nové odrůdy kratší dobu (9–12 let), ale při potřebě kombinovat vlastnosti vzdálenějších genotypů (např. při vnášení odolnosti k padlí z olejného typu do přadného) trvá ustálení materiálu mnohem delší dobu. K rychlému snížení genetické variability ve šlechtitelském materiálu může u lnu posloužit prašníková kultura (Friedt et al., 1995). Rutkowska-Krause et al. (2001) popisují dihaploidní linii odvozenou prašníkovou kulturou z odrůdy přadného lnu Alba s vyšším stupněm odolnosti k fusariovému vadnutí ve srovnání s původní odrůdou. Prašníkovou kulturou vznikají dihaploidní jedinci – úplně homozygotní, v dalších generacích neštěpící – během jediného roku. Metoda prašníkové kultury výrazným způsobem zkracuje šlechtitelský cyklus a urychluje tak tvorbu nových odrůd lnu. Zařazení prašníkové kultury do šlechtění může zkrátit šlechtitelský cyklus nejméně o 6 let. Použití metody prašníkové kultury umožní šlechtitelům lnu rychleji reagovat na měnící se požadavky na vlastnosti nových odrůd jak přadného, tak i olejného lnu. V případě aplikace derivátů cytokininů se navíc jedná o zvýšení počtu regerovaných jedinců u širšího spektra genotypů, což opět otevírá širší prostor pro získání nových odrůd.

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) a poskytnutí institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace č.RO1016.

1.4 Popis uplatnění Certifikované metodiky

Metodika je určena studentům vysokých škol s výukou zaměřenou na šlechtění rostlin a využití biotechnologických metod, především však je určena k praktickému využití při šlechtění lnu. Materiální i personální vybavení nutné pro použití metody prašníkové kultury je v porovnání s jejím přínosem zanedbatelné. Navíc, v současné době je možné navázat výhodnou spolupráci mezi šlechtiteli, kteří nemají potřebné laboratorní vybavení pro práci s *in vitro* kulturami, a organizacemi s potřebným technickým zázemím pro tuto práci.

1.5 Ekonomické aspekty

Realizace inovované metodiky za použití cytokininových derivátů a tím potenciální zvýšení produkce dihaploidních linií lnu představuje pro šlechtitele přímý finanční přínos jednak ve formě zkrácení šlechtitelského cyklu, jednak formou úspor při pěstování a šlechtění. Dojde zejména k úspoře časových, materiálních a tedy i finančních zdrojů u šlechtitelských organizací. Rok šlechtitelské práce představuje náklady ve výši zhruba 100.000,-Kč jedná se tedy o úsporu v řádu 500.000,-Kč za dobu, o kterou se díky dihaploidizaci zkrátí čas nutný k získání nové odrůdy.

2 Popis

Metodika prašníkové kultury u lnu byla ve firmě Agritec vyvíjena na základě řady publikovaných prací (Sun a Fu, 1981, Nichterlein et al., 1989, Nichterlein et al. 1991, Rutkowska-Krause et al., 1995 a dalších) a dlouhé řady vlastních experimentů majících za cíl prostudovat vliv různých faktorů na prašníkovou kulturu a nalézt co nejefektivnější způsob produkce dihaploidních linií lnu aplikovatelný na široký šlechtitelský materiál. Výsledky mnohaleté práce byly použity při vypracování vnitřní metodiky pro šlechtění lnu firmy Agritec (Tejcklová, 2003b). V rámci projektu TA04020547 byly v posledních 3 letech (2014–2016) provedeny další experimenty a podle jejich výsledků pak byla metodika prašníkové kultury optimalizována do nynější podoby.

Cyklus regenerace rostlin z prašníků u lnu probíhá v následujících krocích: indukce kalogeneze v prašnicích, regenerace pupenů z kalusu, kultura mnohonásobných prýtů, zakořeňování prorůstajících prýtů, převod kompletních rostlin do nesterilních podmínek, kolchicinování haploidních regenerantů, dopěstování rostlin do zralosti, sklizeň semen.

2.1 Tvorba donorového materiálu

Donorové rostliny pro odběr prašníků jsou pěstovány pokud možno při nižších teplotách (minimální denní teploty 5–10 °C, maximální denní teploty 15–20 °C).

Pokud jsou rostliny pěstovány ve vegetačních nádobách, kontejnerech apod., doporučuje se základní hnojení před výsevem: 0,857 g NH_4NO_3 + 1,717 g $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 1,665 g K_2SO_4 na jednu vegetační nádobu o objemu 5 l. Výsev do sponu 3×3 cm. Od fáze rychlého růstu přihnojovat 1× za 14 dní plným hnojivem, např. Wuxal Super (AgroBio, Opava) dle návodu. Regenerační schopnost mikrospor je vyšší při pěstování donorových rostlin na krátkém dni, proto je vhodné při pěstování lnu běžným způsobem, kdy rostliny začínají kvést

v první polovině června, krátit světelnou periodu asi týden před butonizací na cca 8–9 hodin zakrýváním rostlin černými plátěnými kryty (obr. 1).

2.2 Založení prašnickových kultur

2.2.1 Zásady práce ve sterilních podmínkách

Příprava kultivačního média pro *in vitro* kulturu – obecně

K přípravě kultivačních médií se používají chemikálie v čistotě p.a. Za spolehlivě kvalitní lze považovat chemikálie z nabídky firem Vitrum, Duchefa a Sigma-Aldrich. Při přípravě kultivačního média se vždy používá destilovaná nebo deionizovaná voda. Agar lze rozvařovat buď ve vodní lázni, nebo v mikrovlnné troubě; nesmí se nechat vícekrát ztuhnout a znovu rozvařovat. Sterilizace médií probíhá v autoklávu 15 minut při 121 °C.

Média se připravují bezprostředně před použitím. Pokud nejsou použita ke kultivaci ihned, je vhodné je krátkodobě uskladnit v chladničce při 4 °C.

2.2.2 Izolace a sterilizace poupat lnu

Natrhát poupata o délce asi 5–6 mm a šířce asi 1,8 mm u olejných lnů a o délce asi 4–5 mm a šířce asi 1,5 mm u přadných lnů (poupata o maximální velikosti, při které ještě nejsou zabarveny korunní lístky), odstranit případné přiléhající listy (obr. 2a). Nejúspěšnější je regenerace z několika prvních poupat vyrůstajících na rostlině.

Poupata krátce opláchnout 70% etanolem, poté krátce propláchnout destilovanou vodou, zalít 1% Chloraminem B (Bochemie a.s., Bohumín), protřepávat 3 min., slít použitý a nalít čerstvý roztok Chloraminu B, opět na 3 min. na třepačku a nakonec (od této chvíle pracovat sterilně - ve sterilním boxu, se sterilními nástroji) Chloramin B slít a poupata 3× důkladně propláchnout sterilní destilovanou vodou (destilovanou vodou sterilizovanou v autoklávu 15 min. při 121 °C). Místo uvedeného použití Chloraminu B je možné poupata protřepávat 20 min. v 7% roztoku chlorového vápna (JOVI-FERT, Praha).

2.2.3 Izolace prašníků, prašnickové kultury a indukce kalogeneze

Pinzetou uchopit poupě, ze strany květní stopky odkrojit skalpelem asi 1 mm segment z kalichu (prašníky nesmějí být poškozené), rozhrnout kališní a korunní lístky a vyjmout prašníky bez nitek (obr. 2b). U barevně kvetoucích genotypů by měly být korunní lístky ještě bělavé, u bělokvětých je určení správné fáze květu obtížnější. Prašníky pokládat na povrch agarového média AC (příprava viz Přílohy, Tabulka 1) pro indukci kalogeneze do Petriho misek (maximálně 50 prašníků do misky o průměru 10 cm s 20 ml kultivačního média), misky uzavřít parafilmem (Parafilm M, PECHINEY, Chicago) nebo proužkem potravinové fólie.

Izolace poupat, jejich sterilizace a izolace prašníků se musí provádět rychle, neboť pletiva prašníků rychle podléhají nepříznivému vlivu nedostatku výživy a přítomnosti sterilizační látky, kterou je obtížné z poupat vypláchnout bezezbytku.

Indukce kalogeneze: Vyjmuté prašníky jsou kultivovány 1 týden na světle (16 hod. fotoperioda, 22/20 °C den/noc), pak jsou přeneseny na 1 týden do tmy při 21 °C a poté opět na světlo. V prašниковých pouzdech se začínají vytvářet z mikrospor kalusy, prašниковá pouzdra praskají a kalusy nadále zvětšují svůj objem (obr. 3). Indukce kalogeneze je nejvyšší třetí až pátý týden po izolaci prašníků.

2.3 Aplikace regulátorů metabolismu cytokininů, regenerace pupenů

Zelené kalusy o velikosti 2–5 mm v průměru (obr. 4) přenést na regenerační médium AB-I (viz Přílohy, Tabulka 2; po 5 ks do 100ml Erlenmayerových baněk s 25 ml média) a kultivovat na 16 hod. dni, 22/20 °C den/noc. Vždy po 3 týdnech kalusy pasážovat na čerstvé médium stejného složení, přitom odstranit nekrotické (hnědnoucí) části, velké kalusy rozdělit na kousky o průměru cca 5 mm (obr. 6). Kalus může rovněž vznikat ze somatických pletiv – z prašnikového pouzdra nebo i z nitky, pokud nebyla od prašníku oddělena. Regenerant z takového kalusu má genotyp donorové rostliny a k produkci dihaploidů je tedy nepoužitelný. Zdrojem genetické variability u regeneranta může být vzácně rovněž projev somaklonální variability. Regenerace pupenů v kalusech (obr. 5a) probíhá hlavně během prvních tří subkultur na regeneračním médiu, později jen vzácně.

2.4 Dlouhodobá kultura mnohonásobných prýtlů

Dlouhodobá kultura mnohonásobných prýtlů: Vyvíjející se shluky pupenů o velikosti cca 3 mm udržovat na médiu L (viz Přílohy, Tabulka 3). Pravidelně po 2–4 týdnech přenášet explantáty na čerstvé médium, přitom odstraňovat nekrotické části a kalus, vyvíjející se prýty použít pro zakořeňování. Kultivovat na 16 hod. dni, 22/20 °C den/noc, vyšší teploty vedou k silnější kalogenezi.

V uvedených podmínkách se neustále zakládají nové pupeny, které se prodlužují v prýty (obr. 5b, 7a).

Oživení kultury: Je-li kultura udržována tak dlouho, že se sníží produkce nových pupenů a prýtlů, je vhodné buď kulturu přepasážovat na týden na médium iniciační = Li (= L médium, ale s obsahem BAP zvýšeným na 1 µM) a pak opět kulturu udržovat na L médiu.

2.5 Regenerace kompletních rostlin

Zakořeňování prýtů: Z dlouhodobé kultury mnohonásobných prýtů se postupně odebírají 2–3 cm dlouhé prýty normálního vzhledu (ne sklovité) (obr. 7b), odřezávají se ostrým skalpelem a vpichují se svisle (ne zešikma) do zakořeňovacího média R (viz Přílohy, Tabulka 4). Často zakořeňují prýty i na médiu MS bez růstových regulátorů. Prýty vytvoří dostatek kořenů zpravidla do dvou týdnů (obr. 8).

Převod do nesterilních podmínek: Zemina pro regenerované rostliny musí být jemná, hlinitopísčitá, s malým podílem humusu: smíchají se písčito-hlinitá ornice, písek a rašelina v poměru 6:2:1, pH kolem 5,5; zakořeňené prýty s co nejmenším kalusem na bázi se důkladně opláchnou, aby se zbavily agarů, ponoří se na minutu do 0,15% roztoku Previcuru, vysadí do květináče s vysterilovanou zeminou (autokláv – 1 hod. při 121 °C) a pro začátek se zakryjí průhledným krytem (sklo, igelit); vysazené rostlinky je vhodné umístit do klimatizované a výbojkami osvětlené komory (16 hod. den, 8 hod. noc, 12 000 lx, 22 °C); po ujetí (po cca 7 dnech od výsadby) se kryt poodkryje a další den, pokud rostlinky nevadnou, úplně odstraní (obr. 9a).

Dopěstování rostlin do semen: K tomu, aby rostliny lnu vykvetly, je nutný dlouhý den (15–16 hod.) a dostatečná intenzita světla (nad 10 000 lx); zálivka vodou tak, aby zemina na povrchu květináče občas vyschla, ale aby rostliny neuvadaly; podle potřeby přihnojovat kombinovaným hnojivem, velmi vhodný je Wuxal Super, kterým se provádí zálivka jednou za 14 dní při doporučené koncentraci 2 ml/l.

2.6 Determinace ploidie regenerantů

Určení ploidie u získaných regenerantů probíhá pomocí flow-cytometrie. Touto metodou lze rozlišit haploidní, diploidní, tetraploidní jedince. K tomuto účelu byl použit malý vzorek kontrolní (dihaploidní) rostliny (původní genotyp, z jehož oprašníků regenerujeme haploidní prýty) – standard, a následně pletiva z jednotlivých testovaných rostlin.

2.7 Indukovaná diploidizace a tvorba dihaploidního potomstva

Působením kolchicinu se zdvojnásobí počet chromozómů v dělících se buňkách meristémů, takže z původně haploidní buňky vzniká diploidní pletivo (v tomto případě se označují jako dihaploidní), jehož buňky mají dvě sady naprosto stejných chromozómů a z kterého pak vyrůstá fertilní rostlina, případně větev. Potomstvo těchto regenerantů tedy nebude štěpit v žádném ze znaků.

Rostlina regenerovaná z prašnickové kultury, u které byl cytometricky stanoven haploidní počet chromozómů nebo která vykazuje znaky haploida (subtilní rostlina, průduchy dosahují jen dvou třetin velikosti průduchů kontroly, po

odkvětu se nezakládají tobolečky), se dekapituje. Stonek se ohne a asi 1 cm dlouhý konec s řeznou plochou se ponoří na 24 hod. Do epruvety s 1 ml 1% kolchicinu. Epruveta se ke stonku připevní alobalem (obr. 9b,c). Epruveta se z vrcholu rostlin odstraní dříve než za 24 hod. v případě, že na rostlině jsou listy již silně povadlé. To znamená, že kolchicin se do rostliny dostal v dostatečné míře a jeho další pronikání by mohlo způsobit úhyn rostliny. Větve vyrůstající z axilárních pupenů nejbližší k dekapitovanému vrcholu jsou obvykle dihaploidní a vyvíjejí se na nich semena.

Působením kolchicinu mohou teoreticky vznikat i pletiva s vyšším stupněm ploidie nebo aneuploidní. Větve vyvinuté z těchto pletiv budou pravděpodobně sterilní. Tyto případy zatím nebyly pozorovány.

Ošetření kolchicinem se neprovádí u spontánních diploidů.

3 Seznam použité literatury

- NICHTERLEIN, K., UMBACH, H., FRIEDT, E.: Investigations on androgenesis in breeding of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Votr. Pflanzenzüchtg., 15: 13–25, 1989.
- NICHTERLEIN, K., UMBACH, H., FRIEDT, E.: Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Euphytica, 58: 157–164, 1991.
- FRIEDT, W., BICKERT, C., SCHAUB, H.: *In vitro* breeding of high-linolenic, doubled-haploid lines of linseed (*Linum usitatissimum* L.). Plant Breeding 114: 322–326, 1995.
- POLIAKOV, A. V., PROLIOTOVA, N. V., RUTKOWSKA-KRAUSE, I.: Some aspects of flax anther culture (*Linum usitatissimum* L.). Cytology and pretratment. Natural Fibres, 39: 21–28, 1995.
- RUTKOWSKA-KRAUSE, I., MANKOWSKA, G., POLIAKOV, A. V., PROLIOTOVA, N. V.: Plant regeneration through anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.). Proc. 3rd Meet. Int. Flax Breeding Res. Group, Saint-Valery-en-Caux, France, 1995, pp. 83–90.
- RUTKOWSKA-KRAUSE, I., POLIAKOV, A. V., MANKOWSKA, G.: Observation of heredity changes among plants regenerated in flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. Proc. Second Global Workshop Bast Plants in the New Millennium, Borovets, Bulgaria 2001: 111–120.
- SUN, H. T., FU, W. D.: Induction of haploid plants of flax (*Linum usitatissimum* L.) by anther culture and preliminary observations on their progeny. Acta Genet. Sin., 8: 369–374, 1981.
- TEJKLOVÁ, E.: Metodika šlechtění lnu. Praktická příručka pro šlechtitele lnu s podrobnou metodikou prašnickové kultury. Vydáno vlastním nákladem firmy Agritec, 2003b.

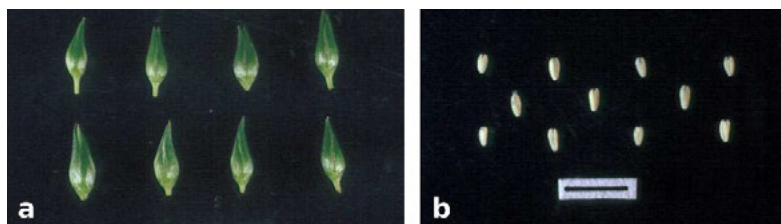
4 Seznam publikací, které předcházely metodice

- PAVELEK, M., TEJKLOVÁ, E., VRBOVÁ, M., ONDŘEJ, M. (2011): Breeding of fibre flax and linseed in sustainable agriculture. Handbook of Natural Fibres, Woodhead publishing Ltd., Abington Hall, Abington, Cambridge, CB21 6AH, UK.
- JAKUB HRDLÍČKA (2013): Izolace a kvantifikace cytokininů ve vybraném rostlinném materiálu (pomocí UPLC – MS/MS). Bakalářská práce, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, UPOL.
- JAKUB HRDLÍČKA (2015): Studium role cytokininů v nepřímé organogenezi vybraných hospodářsky významných druhů rostlin. Diplomová práce, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum UPOL.
- VRBOVÁ, M., GRIGA, M. (2016): Utilization of the new synthetic derivatives of cytokinins for production of doubled-haploid flax (*Linum usitatissimum* L.), Vienna International Conference Series, Plants In Vitro: Theory and Practice, 8-10. února, Vídeň, Rakousko, abstrakt, str. 28.

5 Přílohy



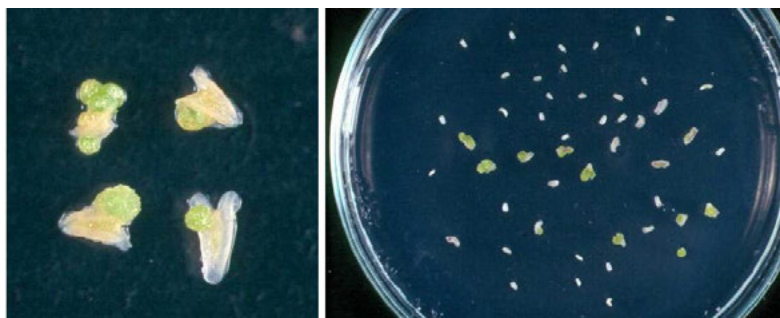
Obr. 1: Zkracování dne na 8 až 9 hodin zakrýváním rostlin černým plátěným krytem.



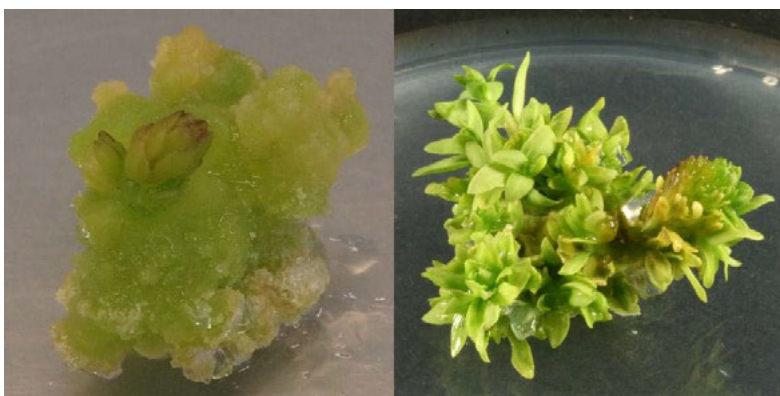
Obr. 2: Poupata připravená ke sterilizaci (a) a prašníky izolované z pupat (b). Úsečka = 5 mm.



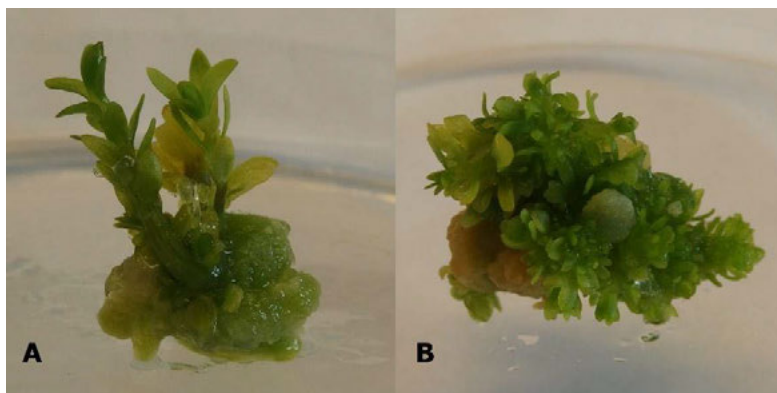
Obr. 3: Vývoj kalusu z mikrospory na indukčním médiu.



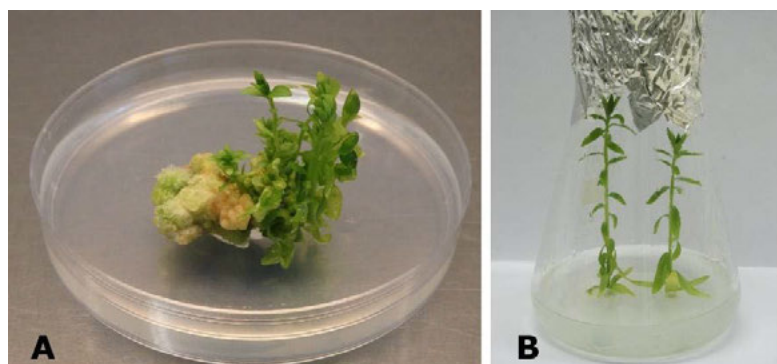
Obr. 4: Kalusy vhodné k přenesení na regenerační médium.



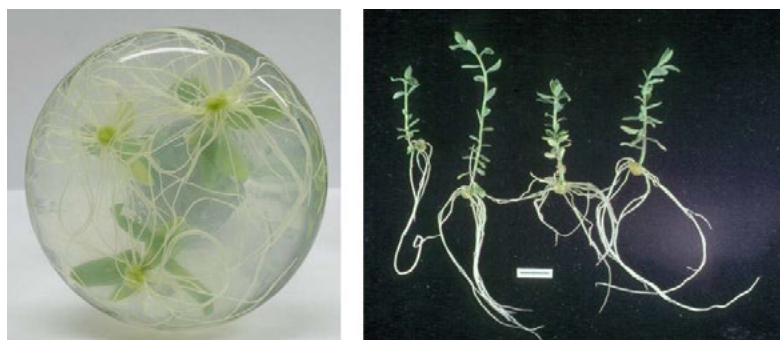
Obr. 5: Vývoj prýtlů z regenerovaných pupenů.



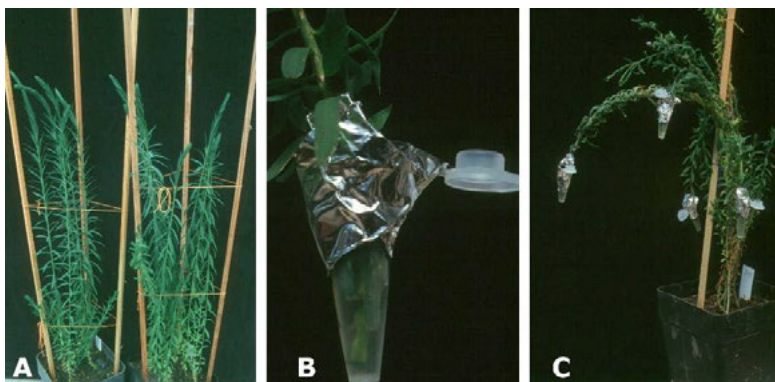
Obr. 6: Kalusy s prýty na A) původním AB B) obohacené o INCYDE



Obr. 7: Prýty z dlouhodobé kultury A) na kalusu B) pasážované na zakořeňovací médium

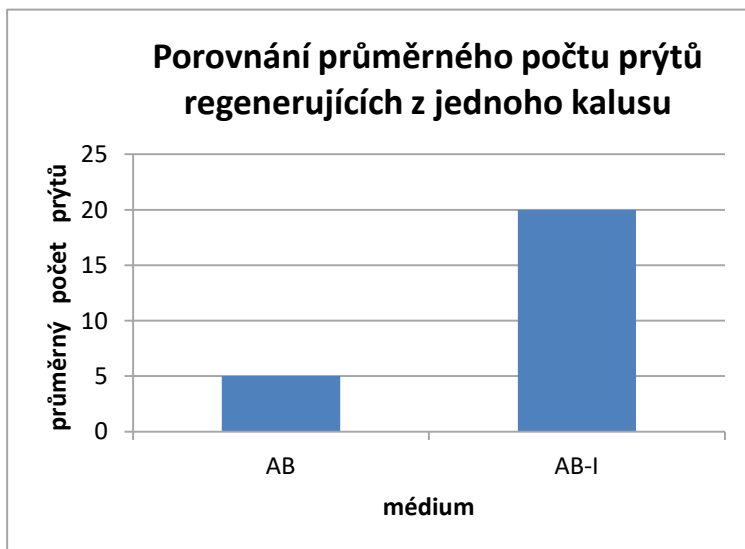


Obr. 8: Ukázka zakořeněných prýtů a délky kořenů po 8 týdnech



Obr. 9: Rostliny po vysazení A) měsíc B) detail aplikace Kolchicinu C) celá rostlina

Graf č.1: Porovnání průměrného počtu prýtů regenerujících z jednoho kalusu na médiu AB (původní médium) a AB-I (s přidaným derivátem INCYDE)



Tab. 1: **Médium AC** (pro indukci kalogeneze v prašnicích lnu)

Složky média	mg/l kult. média	Zásobní roztok	Postup
NH ₄ NO ₃	165	1,65 g	Roztok AC A Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky.
KNO ₃	1900	19,0 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4,4 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3,7 g	
KH ₂ PO ₄	170	1,7 g	
H ₃ BO ₃	6,2	0,062 g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,8	0,168 g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,086 g	
KI	0,83	0,083 g	Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do 100 ml odměrné baňky. Doplnit vodou do 100 ml, označit jako AC B , odebrat 10 ml a odebranou část nalít do litrové baňky s roztokem A. Doplnit vodou do 1000 ml a tím se získá zásobní roztok makro- a mikroprvků AC makro-mikro . Používá se 100 ml zás. roztoku na 1 litr kultivačního média.
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,025 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0025 g	
Na ₂ EDTA	37,3	7,45 g	Chemikálie rozpustit každou zvlášť, pak smíchat, doplnit do 1000 ml, zahřívát pomalu za stálého míchání, až je roztok FeEDTA tmavožlutý, opaleskující. Nesmí se vařit. Používá se 5 ml na 1 litr kultiv. média.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	5,57 g	
kyselina nikotinová	0,5	0,05 g	AC vit. Jednotlivé složky rozpouštět ve vodě a slévat do 100 ml baňky, doplnit do 100 ml vodou. Vznikne tak zásobní roztok vitamínů, ze kterého se používá 1 ml na 1 litr kultivačního média.
pyridoxin HCl	0,5	0,05 g	
thiamin HCl	1	0,1 g	
myo-Inositol	100	1g	AC inositol Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml.
glycin	2	0,02 g	AC glycin Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml.
NAA	1	0,05 g	AC NAA Rozpustit v čistém lihu na lodičce, slít do 50 ml odměrné baňky s asi 25 ml horké vody, zamíchat, doplnit do 50 ml studenou vodou. Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
meta-topolin	2	0,05 g	AC meta-topolin Důkladně rozpustit v 1 N KOH na lodičce, slít do 50 ml odměrné baňky, doplnit do 50 ml studenou vodou. Používají se 2 ml na 1 litr kultivačního média.
L-glutamin	0,75 g		Navážit a přidat přímo do kultivačního média

maltóza	30,0 g		Navážit a přidat přímo do kultivačního média
sacharóza	30,0 g		Navážit a přidat přímo do kultivačního média
Agar rozvažovaný	5,5 g		Navážit a přidat přímo do kultivačního média
pH	5,5		Upravit pH roztoku přikápnutím 1N KOH za stálého míchání před přidáním agaru

POSTUP přípravy 1 l kultivačního média: do 250 ml kádinky nalít cca 80 ml vody, pak postupně odměřovat množství na 1 l z jednotlivých zásobních roztoků **AC makro-mikro, FeEDTA, AC vit., AC inositol, AC glycin, AC NAA, AC meta-topolin**, přidat navážené množství glutaminu, zamíchat a rozpustit, přidat maltózu a sacharózu, na míchačce rozpustit. Upravit pH přidáním 1N KOH. Do odměrné baňky o objemu 1 l navážit agar, přilít připravený roztok solí, vitamínů, doplnit vodou do 1 l. Autoklávovat v Erlenmeyerově baňce o objemu 1 l, zakryté alobalem, pak ve flowboxu rozlít po 20 ml do sterilních Petriho misek o průměru 10 cm (50 misek zabalených po 10 ks do alobalu se sterilizuje předem v horkovzdušném sterilizátoru při 150 °C). Po zchládnutí média misky opět zabalit do alobalu.

Tab. 2: Médium AB-I (pro indukci pupenů v kalusech z prašníků lnu)
tedy původní AB dle Metodiky prašníkové kultury lnu, obohacené o INCYDE

Složky média	mg/l kult. média	Zásobní roztok	Postup
NH ₄ NO ₃	1650	16,5 g	Roztok AB A Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky.
KNO ₃	1900	19,0 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4,4 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3,7 g	
KH ₂ PO ₄	170	1,7 g	
H ₃ BO ₃	6,2	0,062 g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,8	0,168 g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,086 g	Použít zásobní roztok AC B - odebrat 10 ml a odebranou část nalít do litrové baňky s roztokem AB A. Doplnit vodou do 1000 ml a tím se získá zásobní roztok makro- a mikroprvků AB makro-mikro . Používá se 100 ml zás. roztoku na 1 litr kultivačního média.
KI	0,83	0,083 g	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,025 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0025 g	Použít FeEDTA z roztoku AC . Používá se 5 ml na 1 litr kultiv. média.
Na ₂ EDTA	37,3	7,45 g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	5,57 g	
kyselina nikotinová	0,5	0,05 g	
pyridoxin HCl	0,5	0,05 g	
thiamin HCl	1	0,1 g	Použít AC vit. – 1 ml na 1 litr kultivačního média.
myo-Inositol	100	1 g	
INCYDE	0,27	0,0027 g	Použít AC inositol – 10 ml na 1 litr kultivačního média.
			AB INCYDE Důkladně rozpustit v 1 N NaOH na lodičce, slít do 50 ml odměrné baňky s cca 10 ml vody, doplnit do 50 ml studenou vodou. Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
BAP	1	0,05	AB BAP Důkladně rozpustit v 1 N KOH na lodičce, slít do 50 ml odměrné baňky s cca 25 ml horké vody, doplnit do 50 ml studenou vodou. Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
sacharóza	30,0 g		Navážit a přidat přímo do kultivačního média
Agar rozvažovaný	5,5 g		Navážit a dát rozvařit do asi polovičního množství vody z celkového množství kultivačního média.
pH	5,8		Upravit pH roztoku přikápnutím 1N KOH za stálého míchání před přidáním agaru
POSTUP přípravy 1 l kultivačního média: do 250ml kádinky nalít cca 80 ml vody, pak postupně odměřovat množství na 1 l z jednotlivých zásobních roztoků AB makro-mikro , FeEDTA , AC vit. , AC inositol , AB BAP , AB INCYDE , přidat navážené množství glutaminu,			

zamíchat a rozpustit, přidat sacharózu, na míchačce rozpustit. Upravit pH. Do kalibrované kádinky navážit agar, přilít cca 0,5 l vody, rozvařit agar, za rychlého míchání přilít připravený roztok solí, vitamínů, doplnit vodou do 1 l a důkladně zamíchat. Médium rozlít po 25 ml do 40 ks 100ml Erlenmeyerových baněk, zakrýt alobalem a vyautoklávat.

Tab. 3: **Médium L** (pro produkci prýtů v dlouhodobé kultuře)

Složky média	mg/l kult. média	Zásobní roztok	Postup
NH ₄ NO ₃	1650	16,5 g	Roztok AB A Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky.
KNO ₃	1900	19,0 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4,4 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3,7 g	
KH ₂ PO ₄	170	1,7 g	
H ₃ BO ₃	6,2	0,062 g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,8	0,168 g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,086 g	
KI	0,83	0,083 g	Použít zásobní roztok AC B - odebrat 10 ml a odebranou část nalít do litrové baňky s roztokem AB A. Doplnit vodou do 1 000 ml a tím se získá zásobní roztok makro- a mikro-prvků AB makro-mikro . Používá se 100 ml zás. roztoku na 1 litr kultivačního média.
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,025 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0025 g	
Na ₂ EDTA	37,3	7,45 g	Použít FeEDTA z roztoku AC . Používá se 5 ml na 1 litr kultiv. média.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	5,57 g	
kyselina nikotinová	0,5	0,05 g	L vit. Jednotlivé složky rozpouštět ve vodě a slévat do 100 ml baňky, doplnit do 100 ml vodou. Vznikne tak zásobní roztok vitamínů, ze kterého se používá 1 ml na 1 litr kultivačního média.
pyridoxin HCl	0,5	0,05 g	
thiamin HCl	0,1	0,01 g	
myo-Inositol	100	1 g	AC inositol Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml .
glycin	2	0,02 g	AC glycin Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml .
NAA	0,005 µM	0,018 g	Rozpustit v čistém etanolu na lodičce, slít do 100 ml odměrné baňky s cca 50 ml horké vody, doplnit do 100 ml studenou vodou. Odebrat 0,5 ml do 100 ml baňky, dolít do 100 ml. Tak vznikne roztok L NAA . Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
BAP	0,05 µM	0,022 g	Důkladně rozpustit v 1 N KOH na lodičce, slít do 100 ml odměrné baňky s cca 50 ml horké vody, doplnit do 100 ml studenou vodou. Odebrat 5 ml do 100 ml baňky, dolít do 100 ml. Tak vznikne roztok L BAP . Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
sacharóza	40,0 g		Navází se a přidá přímo do kultivačního média
Agar rozvažovaný	5,5 g		Navází se a dá se rozvařit do asi polovičního množství vody z celkového množství kultivač-

			ního média.
pH	5,5		Upravit pH roztoku přikápnutím 1N KOH za stálého míchání před přidáním agaru
POSTUP přípravy 1 l kultivačního média: do 250 ml kádinky nalít cca 80 ml vody, pak postupně odměřovat množství na 1 l z jednotlivých zásobních roztoků AB makro-mikro, FeEDTA, L vit., AC inositol, AC glycin, L NAA, L BAP , přidat sacharózu, na míchačce rozpustit. Upravit pH. Do kalibrované kádinky navážit agar, přilít cca 0,5 l vody, rozvařit agar, za rychlého míchání přilít připravený roztok solí, vitamínů, doplnit vodou do 1 l a důkladně zamíchat. Médium rozlít po 25 ml do 40 ks 100 ml Erlenmeyerových baněk, zakrýt alobalem a vyautoklávovat.			

Tab. 4: **Médium R** (pro zakořeňování prýtů)

Složky média	mg/l kult. média	Zásobní roztok	Postup
NH ₄ NO ₃	1650	16,5 g	Roztok R A Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky.
KNO ₃	1900	19,0 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4,4 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3,7 g	
KH ₂ PO ₄	170	1,7 g	
H ₃ BO ₃	6,2	0,062 g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,8	0,168 g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,086 g	Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do 100 ml odměrné baňky. Doplnit vodou do 100 ml, označit jako R B - odebrat 10 ml a odebranou část nalít do litrové baňky s roztokem R A. Doplnit vodou do 1000 ml a tím se získá zásobní roztok makro- a mikroprvků R makro-mikro . Používá se 100 ml zás. roztoku na 1 litr kultivačního média.
KI	0,83	0,083 g	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,5	0,025 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0025 g	
Na ₂ EDTA	37,3	7,45 g	Použít FeEDTA z roztoku AC . Používá se 5 ml na 1 litr kultiv. média.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	5,57 g	
kyselina nikotinová	0,5	0,05 g	L vit. Jednotlivé složky rozpouštět ve vodě a slévat do 100 ml baňky, doplnit do 100 ml vodou. Vznikne tak zásobní roztok vitamínů, ze kterého se používá 1 ml na 1 litr kultivačního média.
pyridoxin HCl	0,5	0,05 g	
thiamin HCl	0,1	0,01 g	
myo-Inositol	100	1 g	AC inositol Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml .
glycin	2	0,02 g	AC glycin Rozpustit ve 100 ml vody, do kult. média používat 10 ml .
NAA	0,005 µM	0,0186 g	Použít roztok L NAA . Používá se 1 ml na 1 litr kultivačního média.
sacharóza	40,0 g		Navází se a přidá přímo do kultivačního média
Agar rozvažovaný	5g		Navází se a dá se rozvařit do asi polovičního množství vody z celkového množství kultivačního média.
pH	5,5		Upravuje se 1N KOH

POSTUP přípravy 1 l kultivačního média: do 250 ml kádinky nalít cca 80 ml deionizované vody, pak postupně odměřovat množství na 1 l z jednotlivých zásobních roztoků **AB makro-mikro, Fe EDTA, AB vit., AC inositol, AC glycin, L NAA**, přidat sacharózu, na míchačce rozpustit. Upravit pH. Do kalibrované kádinky navážít agar, přilít cca 0,5 l vody, rozvařit agar, za rychlého míchání přilít připravený roztok solí, vitamínů, doplnit vodou do 1 l a důkladně zamíchat. Médium rozlít po 25 ml do 40 ks 100ml Erlenmeyerových baněk, zakrýt alobalem a vyautoklávat.

