

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



***In vitro* multiplikační protokol planých druhů
(forem) hrachu, rod *Pisum***

Autoři:

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Ing. Jana Šedivá, Ph.D.

Ing. Marie Greplová, Ph.D.

2019

In vitro* multiplikační protokol planých druhů (forem) hrachu, rod *Pisum

Akronym:

Metodika vypracovaná jako výstup projektu Technologické agentury ČR TH03030050 – Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod.

Iva Smýkalová

smykalova@agritec.cz

V roce 2019 vydal AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, <http://www.agritec.cz>

Oponenti:

Ing. Michaela Budňáková – Ministerstvo zemědělství České republiky, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1, 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 – RNDr. Miroslav Griga, CSc., Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

© AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk 2019

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.

ISBN 978-80-87360-62-0

Obsah

1	ÚVOD	2
1.1	CÍL METODIKY	2
1.2	DEDIKACE	2
1.3	NOVOST POSTUPŮ	2
1.4	EKONOMICKÉ ASPEKTY	2
2	PRÁCE <i>IN VITRO</i>, PŘÍPRAVA MATERIÁLU	3
2.1	OBECNÉ ZÁSADY PRÁCE S <i>IN VITRO</i> KULTURAMI	3
2.2	MATERIÁL A POMŮCKY	4
2.3	VÝBĚR GENOTYPŮ	4
2.4	KLÍČENÍ SEMEN <i>IN VITRO</i>	5
2.5	IZOLACE EXPLANTÁTŮ	6
3	ZALOŽENÍ KULTUR MNOHOČETNÝCH PRÝTŮ (MSC)	6
3.1	SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA PRO INDUKCI MSC	6
3.2	HODNOCENÍ MORFOLOGIE SEMEN A LISTŮ	7
3.3	MODIFIKACE MÉDIA PRO DOSAŽENÍ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN V MSC	10
3.4	INDUKCE KOŘENŮ	10
3.5	SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA PRO ZAKOŘEŇOVÁNÍ	13
4	DOPĚSTOVÁNÍ ROSTLIN	14
4.1	AKLIMATIZACE <i>EX VITRO</i>	14
4.2	TVORBA OSIVA	15
5	SCHÉMA MIKROPROPAGACE HRACHU, ROD <i>PISUM</i>	17
5.1	HARMONOGRAM TVORBY MSC, <i>IN VIVO</i> REPRODUKCE MATERIÁLU	17
5.2	MIKROPROPAGAČNÍ SYSTÉMY	18
6	ZÁVĚR	18
6.1	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	18
6.2	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	19
6.3	SEZNAM PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE	19

1 ÚVOD

1.1 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je vytvoření obecného postupu mikropropagace *in vitro* pro hrách, rod *Pisum*. Výchozí publikovaný postup mikropropagace u hrachu setého byl testován na planých druzích (formách). Testovala se řada genotypů, u nichž se posuzovala klíčivost semen ve sterilních podmínkách, schopnost responsivity *in vitro* na indukční médium pro odvození kultury mnohonásobných prýtů (MSC), schopnost indukce tvorby kořenů *in vitro*, aklimatizace zakořeněných rostlin, jejich převod do nesterilních podmínek a produkce osiva ze získané populace rostlin odvozené z MSC kultur. Získaný postup je zaměřen na možnost rozšíření variability u kulturního hrachu, včetně zavedení planých druhů hrachu do *in vitro* kultur pro další testování (*in vitro* selekce, polyploidizace a protoplastové kultury).

1.2 DEDIKACE

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory projektů Technologické agentury ČR č. TH03030050 – Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod.

1.3 NOVOST POSTUPŮ

U hrachu setého jsou popsány různé biotechnologické postupy pro řadu genotypů (odrůd, viz **tabulka 3**), ale ve většině případech se jedná o zastaralé nebo modelové, v současnosti již komerčně nevyužívané odrůdy. Při hledání nových genových zdrojů je často pohlíženo na plané formy plodin jako na nositele žádoucích šlechtitelských vlastností, zejména z pohledu odolností k biotickým a abiotickým stresům. Pro nové biotechnologické postupy ve šlechtění však není známa responsivita *in vitro*. Stávající protokol, publikovaný pro hrách setý (*Pisum sativum* L., odrůda Bohatýr, Griga, 1984), byl nově aplikován pro rozšíření možnosti mikropropagace (vytvoření dostatečného množství *in vitro* materiálu) na genotypy rodu *Pisum*, zahrnující především plané druhy (formy) hrachu.

1.4 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Jedním z ekonomických přínosů je možnost zrychleného vývoje nových odrůd hrachu setého, především jejich urychleného testování na různé druhy faktorů (fyzikální, chemické), které simulují stresové podmínky. Takové testování s využitím biotechnologického postupu tvorby *in vitro* kultur mnohočetných prýtů není dosud z ekonomického hlediska hodnoceno. Nicméně tento postup rozšířený na plané

formy hrachu vytváří potenciál pro rychlý screening a selekce potenciálně zajímavých somaklonů. Nový materiál může sloužit v budoucnu jako významný šlechtitelský zdroj pro tvorbu nových odrůd, nebo komponentů šlechtitelských záměrů. Z tohoto pohledu je ekonomické zhodnocení výhledově provázané s konečnými výstupy ve formě odrůd.

2 PRÁCE *IN VITRO*, PŘÍPRAVA MATERIÁLU

2.1 OBECNÉ ZÁSADY PRÁCE S *IN VITRO* KULTURAMI

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 sterilním kabinetu (laminární box), kde je zaručen sterilní provoz. V laminárních boxech 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, média, 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 otřen 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 rozvarí v mikrovlnné troubě. Připravená média lze krátkodobě uskladnit v chladničce při teplotě 4 °C do doby jejich použití.

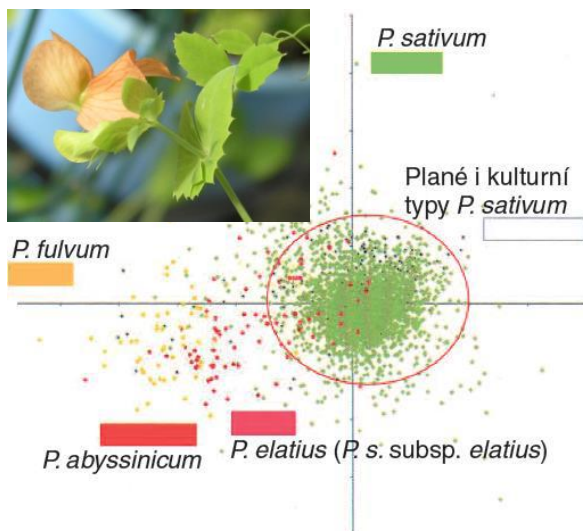
2.2 MATERIÁL A POMŮCKY

- osivo
- Erlenmayerovy baňky (100ml, 250ml)
- pinzety, skalpely
- Petriho misky (podložní k manipulaci s klíčními rostlinami a explantáty)
- skleněné nebo plastové nádoby na přípravu médií (zásobní roztoky)
- pH metr
- horkovzdušná sušárna a autokláv pro sterilizaci pomůcek a médií, substrátů
- binokulární lupa
- plastové jednorázové kontejnery (10 × 10 × 9 cm)
- perlit
- komerční substrát na dopěstování rostlin (pH 6–7)

2.3 VÝBĚR GENOTYPŮ

Pro zavedení *in vitro* kultur se vychází z dostupných materiálů, například z genových zdrojů (Agritec – genová banka luskovin, www.agritec.cz).

Příklady planých forem druhů hrachu, které se vztahují k metodice: *P. pseudo-roseum*, *P. elatius*, *P. episcopi*, *P. superfluens*, *P. dinocarpum*, *P. glaucospermum*, *P. koernickei*, *P. thebaicum*, *P. balticum*, *P. nigroumbilicatum*, *P. mesomelan*, *P. abyssinicum*, *P. fulvum*, *P. capucinatorum*, *P. jomandii*. Komerční odrůdy: *P. sativum* Terno, Menhir, peluška *P. sativum* var. *arvense* odrůda Arvika.



Schema 1: Genetická diverzita druhů a poddruhů rodu *Pisum* (převzato Smýkal a kol. 2011).

Významné determinační znaky jsou antokyanová skvrna na bázi palistů, barva květu (odlišné zbarvení pavězy a křídel, **obrázek 1**), listový typ, tvar a charakter listů (celokrajný až pilovitý, hrotitý až tupý), tvar a barva semen. Tmavé zbarvení květů souvisí s výskytem antokyanové skvrny a tmavým zbarvením semen, tj. významné znaky pro křížení a stanovení vzájemné křížitelnosti druhů.



Obrázek 1: Barva květu – charakteristický znak. Bílý květ – většina komerčních odrůd, peluška *P. sativum* var. *arvense* je výjimkou (Arvika). Příklady planých druhů hrachu pro bílý květ – *P. balticum*, růžový květ – *P. pseudoroseum*, světle fialový – *P. abyssinicum*, fialový – *P. jomandii*.

2.4 KLÍČENÍ SEMEN *IN VITRO*

Sterilní výsev semen zahrnuje výběr vyzrálých semen, sterilizaci a výsev semen dle interních metodik. Připraví se 250ml Erlenmayerovy nádoby na sterilní výsev, vloží se na dno buničitá vata (čtverce 6 × 6 cm, vrstva 0,5 cm) a kulatý výsek filtračního papíru (průměr 70 mm), zaleje se destilovanou vodou, tak aby se voda zcela vsákla do vaty. Připraví se sterilní destilovaná voda (objem ½–1 litr). Ke sterilizaci vody a připravených Erlenmayerových nádob s vatou se použije autokláv. Přebíraná semena se dají do kádinky, opláchnou se 96% etanolem, scedí se přes sítko, 20 minut se sterilizují 10% chloraminem na třepačce (50–100 otáček za minutu dle množství osiva), osivo se v laminárním boxu opláchně třikrát sterilní destilovanou vodou přes sítko. Vysterilizované osivo se umístí pinzetou po 5 až 10 semenech do připravených Erlenmayerových nádob s buničitou vatou, uzavře se sterilní hliníkovou fólií, označí se a umístí do tmy. Teplota klíčení může probíhat při pokojové teplotě (22 ± 2 °C, obvykle po dobu 4–7 dnů, doba klíčení je závislá na genotypu).

Semena většiny planých druhů hrachu jsou klíčivá *in vitro* a lze je použít pro odvození *in vitro* kultur. Předpokládaná variabilita *in vitro*, včetně reakce na *in vitro* podmínky je genotypově závislá. Týká se to i klíčení semen ve sterilních podmínkách.

2.5 IZOLACE EXPLANTÁTŮ

Metodicky se využívá standardních postupů mikropropagace (interní metodiky dostupné na pracovišti Agritec), založené na izolaci explantátů s preexistujícími meristémy, tj. V – vzrostný vrchol s apikálním meristémem a N – nodální segment se dvěma axilárními meristémy (**obrázek 2**). Z 5 semen můžeme získat celkem 10 explantátů (5 V a 5 N). Postup spočívá v odřezání etiolizovaného vzrostného vrcholu a segmentu nodu (explantace) a tyto explantáty se odřezanou plochou umístí na indukční médium. Předpokládá se indukce mnohočetných pupenů z meristematických základů, z nodálních segmentů se vytváří více pupenů a prýtů, tj. významnější zdroj multiplikace.



Obrázek 2: Postup izolace primárních explantátů – vzrostný vrchol (V) a nodální segment (N) ze sterilně naklíčených semen (práce v laminárním boxu na izolačních miskách se sterilními nástroji – sklapek a pinzeta).

3 ZALOŽENÍ KULTUR MNOHOČETNÝCH PRÝTŮ (MSC)

3.1 SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA PRO INDUKCI MSC

Sledováním responsivity dvou typů primárních explantátů (V a N) na B6 médiu (Griga, 1984) se posuzuje schopnost planých druhů hrachu vytvořit kultury mnohočetných prýtů (multi-shoots culture, MSC), které jsou standardním výchozím typem kultur pro různé další biotechnologické postupy. Složení B6 média, tj. MSB médium (makroprvky Murashige a Skoog, 1962, vitamíny Gamborg a kol., 1968)

s 20 μM BAP a 0,1 μM NAA, 30 g/l sacharózy je uvedeno v **tabulce 1**. U některých planých forem dochází na B6 médiu pouze k tvorbě kalusu (*P. episcopi*). Opakovaná kultivace získaných kultur na B6 médiu se využívá pro dlouhodobé udržování MSC kultur (Plačková a kol., 2015).

3.2 HODNOCENÍ MORFOLOGIE SEMEN A LISTŮ

U planých forem se rozlišuje morfologie *in vitro*, zejména listů a semen (získaných po přesevu), která odpovídá morfotypům genotypů pěstovaných v nádobách nebo v polních podmínkách (polní deskriptory). Na **obrázku 3** jsou uvedeny příklady zdrojových materiálů ve formě semen získaných z přesevů, kdy dochází k barevné změně v závislosti na době skladování. Tvar a barva semen jsou rovněž zahrnuty do identifikace planých druhů hrachu jako významné kvalitativní znaky. Morfologická identifikace planých druhů hrachu, které se liší od současných komerčních odrůd, je součástí metodiky jako významný faktor pro identifikaci položky a jako významná pomůcka při křížení materiálů. Přesev *in vitro* slouží k namnožení materiálu a zejména k tvorbě somaklonů. Morfologické odlišnosti, které jsou pozorovány v *in vitro* kulturách, jsou zdrojem zajímavých šlechtitelských materiálů.

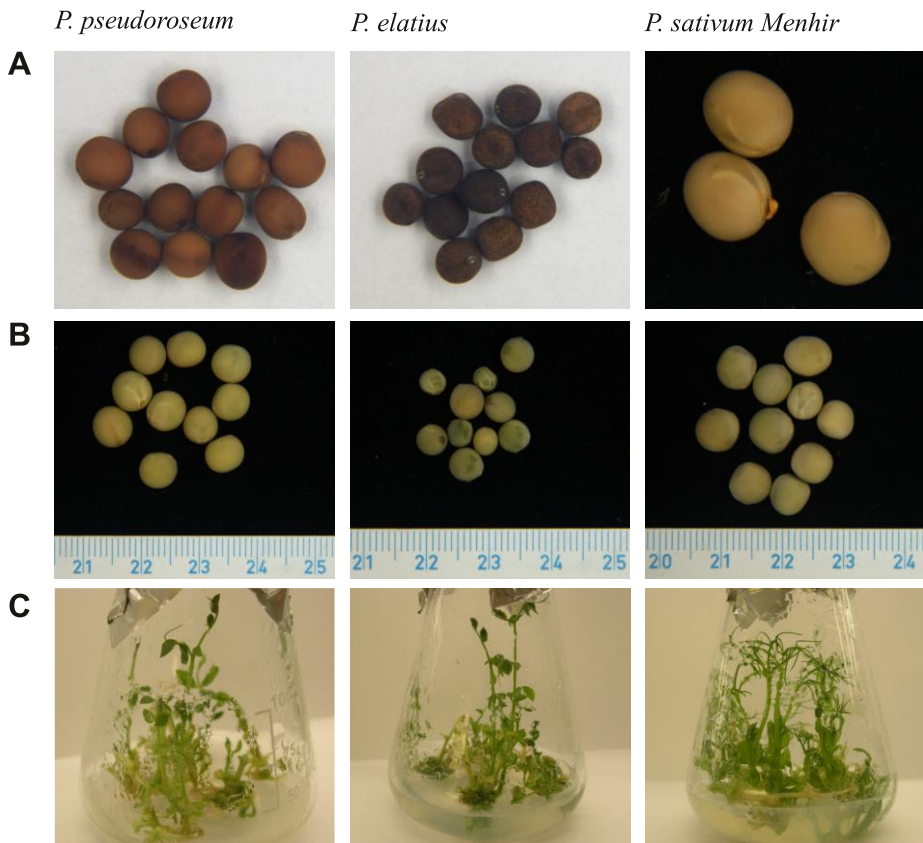
Popis morfologie nadzemních částí patří mezi významné identifikační znaky (http://genbank.vurv.cz/genetic/nar_prog_rostlin/klasifikatory/Pisum.pdf). Sledování morfotypů je jedna z možností sledování. Vytvoří se jednotlivé kategorie, často vypovídající o příbuzenské vzdálenosti planých druhů (forem) a současných komerčních odrůd. Na **obrázku 4** jsou uvedeny příklady morfologicky nejvzdálenějších kategorií prýtlů, sledovaných při kultivaci *in vitro*.

Genetická vzdálenost rodu *Pisum* včetně planých druhů (poddruhů, forem) hrachu rozvržená do 4 skupin (Smýkal 2011) se odráží rovněž ve fenotypovém odlišování listů. Tvar a pilovistost listů *in vitro* umožňuje sledování vytváření případných morfologických změn (somaklonů) během *in vitro* mikropropagace. Metodika popisuje stanovené listové morfotypy – morfologicky odlišné kategorie (**obrázek 5**), které slouží ke sledování morfologických změn vlivem *in vitro* kultivace.

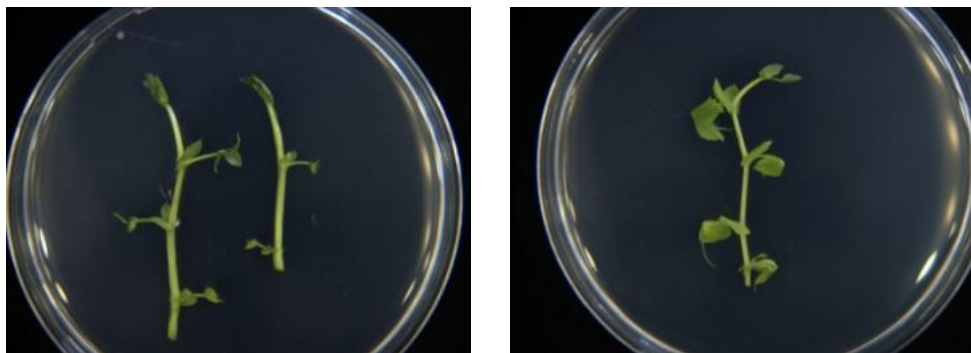
Tabulka 1: Složení kultivačního média pro tvorbu mnohočetných prýtlů, základní makroprvky a mikroprvky (Murashige a Skoog, 1962) a B5 vitamíny (Gamborg a kol., 1968).

makroprvky	médium (mg/1000 ml)	zásobní roztok (1000 ml)	příprava odpipetovaný objem
CaCl ₂	332,02	6,64 g	komponenty postupně navažovat do kádinky, rozpouštět v destilované vodě do konečného objemu 1000ml; aplikace 50,0 ml zás. roztoku na 1000 ml média
KNO ₃	1900,00	38,00 g	
MgSO ₄	180,54	3,61 g	
KH ₂ PO ₄	170,00	3,40 g	
NH ₄ NO ₃	1650,00	33,00 g	
mikroprvky	médium (mg/1000 ml)	zásobní roztok (1000 ml)	příprava odpipetovaný objem
roztok A			
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	2,50 mg	navážit, postupně přidávat do 100ml destilované vody; aplikace 0,5 ml zás. roztoku na 1000 ml média
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	2,50 mg	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	25,00 mg	
KI	0,83	83,00 mg	
roztok B			
H ₃ BO ₃	6,20	62,00 mg	navážit, postupně přidávat do 100ml destilované vody, aplikace 5,0 ml zás. roztoku na 1000 ml média
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	169,00 mg	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	86,00 mg	
roztok železa			
Na ₂ EDTA	37,25	7,45 g	navážit, rozpustit zvlášť, smíchat, zahřát až roztok zežloutne; aplikace 2,5ml zás. roztoku na 1000 ml média
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85	5,57 g	
vitamíny	médium (mg/1000 ml)	zásobní roztok (100 ml)	příprava odpipetovaný objem
nikotinová kys.	1,00	10,00 mg	navážit, postupně přidávat do 100ml destilované vody; aplikace 10,0 ml zás. roztoku na 1000 ml média
pyridoxin HCl	1,00	10,00 mg	
thiamin HCl	10,00	100,00 mg	
ostatní složky			
myo-inozitol	100,00 mg	navážit, rozpustit zvlášť v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky	
sacharóza	30,00 g	přímá navážka do kádinky, přidání objemů roztoků makro, železa a vitamínů; do kádinky magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchačce do úplného rozpuštění	
pH	5,5	měření a úprava pH (za stálého míchání)	
agar (Difco Bacto)	5,5 g	přímá navážka, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit	
růstové regulátory	médium (mg/1000 ml)	zásobní roztok (10 ml)	příprava odpipetovaný objem
BAP	4,50	22,53 mg	navážit, rozpustit v kapce 1 N NaOH, doplnit na 50 ml destilované vody; aplikace 2 ml zás. roztoku na 1000 ml média
NAA	0,02	18,62 mg	navážit, rozpustit v kapce 96 % etanolu a teplé vodě, doplnit na 50ml destilované vody; aplikace 0,1 ml zás. roztoku na 1000 ml média

Vysvětlivky: BAP 6-benzylaminopurin; NAA 1-naftalenoctová kyselina.



Obrázek 3: Zakládání MSC u planých druhů hrachu – *P. pseudoroseum*, *P. elatius* a *P. sativum* odrůda Menhir (afila typ). Původní osivo (A), přeseté osivo ze skleníku (B), odvozená MSC kultura *in vitro* (C).



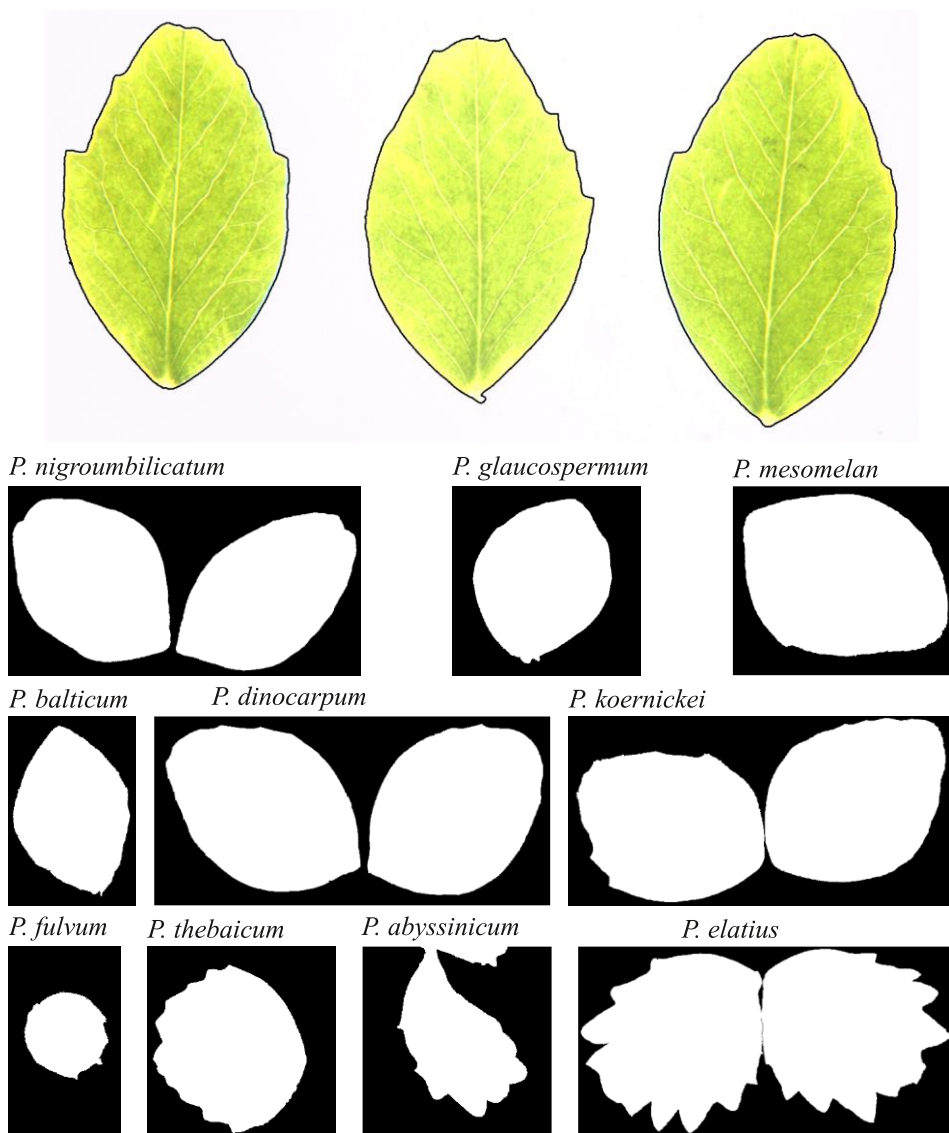
Obrázek 4: Založená MSC kultura u planých druhů hrachu – *P. pseudoroseum* a *P. elatius*.

3.3 MODIFIKACE MÉDIA PRO DOSAŽENÍ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN V MSC

Všechny vytvořené MSC kultury se udržují na B6 médiu pravidelnou pasáží (1× za 3 až 4 týdny). Modifikací složení tohoto kultivačního média (zejména růstových regulátorů) lze ovlivnit morfolologii MSC kultur, zejména délku prýtů a velikost listové plochy. Základní MSB médium je vhodné pro růst explantátů rodu *Pisum* a může sloužit i jako základní médium pro vytvoření kultivačního protokolu pro donorový materiál například pro protoplastové kultury nebo polyploidizaci *in vitro*. Pokud se sníží nebo vynechají přídavky růstových regulátorů do média, dojde k lepšímu zakořeňování a aklimatizaci rostlin. Naopak B6 médium se dá využít pro testování odolnosti planých druhů hrachu například k těžkým kovům (Cd, Zn, Cu atd.) a k získání tolerantních somaklonů (*in vitro* selekce), nebo k rychlému ověření vlastností u testovaných somaklonů. Sledovat tak lze morfologické abnormality a porovnat s původními meriklony nebo kontrolním genotypem, například odrůda Terno hrachu setého (*Pisum sativum* L.) (**obrázek 6**).

3.4 INDUKCE KOŘENŮ

Získané MSC kultury jsou výchozím zdrojem materiálu pro testování schopnosti *in vitro* zakořeňování u planých druhů. Snižování nebo absence růstových regulátorů v médiu vede k lepšímu zakořeňování a aklimatizaci rostlin. Indukce kořenů probíhá na zakořeňovacím médiu, složení je uvedeno v **tabulce 2**. Z výchozího souboru se sleduje počet zakořeňovaných rostlin po první pasáži, nezakořeňené prýty se opět pasážují na zakořeňovací médium. Při hodnocení celého souboru genotypů během tří pasáží (interval 4 týdny = 1 pasáž) na zakořeňovacím médiu se sleduje indukce kořenů prýtů z odřezaných MSC.



Obrázek 5: Příklad využití obrazové analýzy – obrysy nebo prahování na snímcích listů. Kategorizace morfologických fenotypů u planých druhů hrachu. Fenotypizace listů, *in vitro* listové morfotypy – morfologické kategorie na základě planých druhů.

P. sativum L. odrůda Terno (afila typ, listy přeměněny na úponky)



P. sativum L. odrůda Arvika (listový typ, geneticky bližší k planým formám hrachu)



P. nigroumbilicatum (listový typ, planý druh hrachu)



Obrázek 6: *P. sativum* odrůda Terno, odrůda Arvika (peluška), *P. nigroumbilicatum*. Morfologické změny v závislosti na použitém kultivačním médiu. Zdrojová MSC se použije k odřezání pupenů nebo 1–2 nodálních prýtů, vzhled kultury po 3–6 týdnech růstu na MSB0 médiu bez růstových regulátorů, rozvoj listů a sledování typických fialových skvrn v úžlabí listů (*P. nigroumbilicatum*).

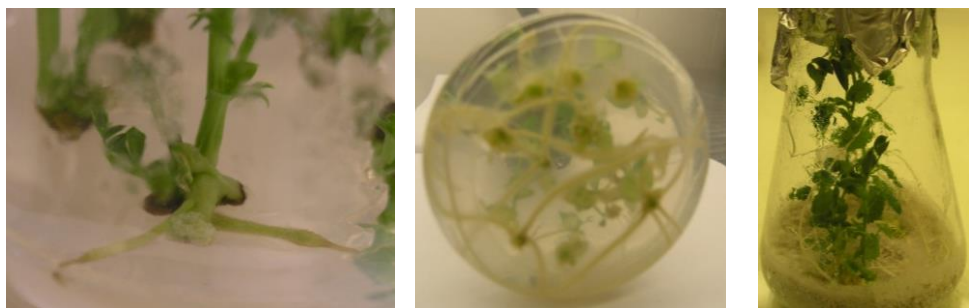
3.5 SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA PRO ZAKOŘEŇOVÁNÍ

Tabulka 2: Složení kultivačního média pro zakořeňování, základní makroprvky a mikroprvky (Murashige a Skoog, 1962) a B5 vitamíny (Gamborg a kol., 1968).

ostatní složky na 1000 ml média		
myo-inozitol	100 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky
sacharóza	40 g	přímá navážka do kádinky, přidání objemů roztoků makro, železa a vitamínů; do kádinky magnetické míchadélko a míchat na magnetické míchače do úplného rozpuštění
růstové regulátory		
NAA (N)	1μM = 0,2 mg	navážít a rozpustit zvlášť asi v 5ml destilované vody; přidat k ostatním složkám média do kádinky
pH	5,8–6,0	měření a úprava pH (za stálého míchání)
agar (Difco Bacto)	5,5 g	přímá navážka, rozpustit ve větším objemu destilované vody a rozvařit

Vysvětlivky: NAA 1-naftalenoctová kyselina.

Tři pasáže na zakořeňovacím médiu se použijí k postupnému navyšování počtu rostlin s indukovanými kořeny (**obrázek 7**). Po první pasáži dochází k indukci kořenů jen u části rostlin, např. u komerční odrůdy Terno polního hrachu (*P. sativum* L.) 30%, u komerční odrůdy Arvika pelušky (*P. sativum*) 71%, u planého druhu hrachu *P. nigroumbilicatum* 29%. Průběh zakořeňování je dán typem explantátu a testovaným genotypem. Tato skutečnost má význam především při mikropropagaci genotypů. Na základě výsledků lze vybrat plané druhy hrachu, které jsou kompatibilní se standardními postupy mikropropagace a tyto materiály se použijí pro další metody k rozšíření variability. Zakořeněné prýty se převedou do perlitu, dále do komerčního substrátu a po aklimatizaci jsou dopěstovány do semenného stavu.



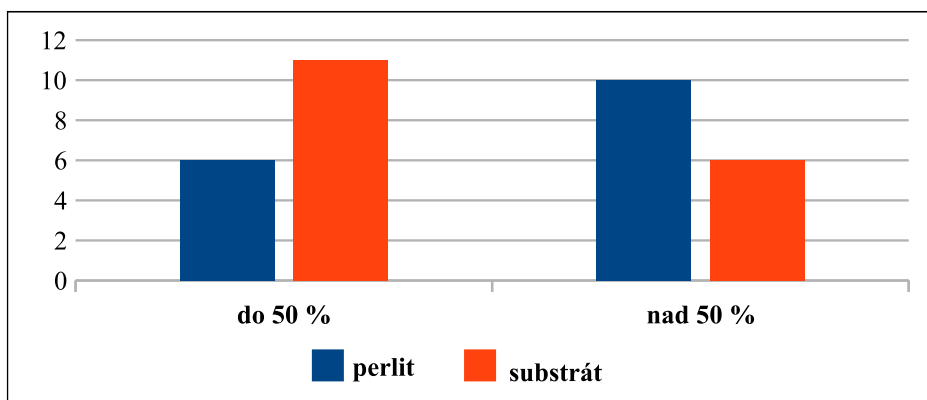
Obrázek 7: Spontánní indukce kořenů na B6 médiu, na zakořeňovacím médiu a rozvoj kořenové soustavy v perlitu.

4 DOPĚSTOVÁNÍ ROSTLIN

4.1 AKLIMATIZACE EX VITRO

Aklimatizace rostlin pocházejících z *in vitro* podmínek je provázána řadou anatomických a fyziologických změn. Hlavní z nich je stavba pokožkových pletiv v závislosti na změně okolní vzdušné vlhkosti. Tyto změny rozhodují o stavu přežití regenerovaných a zakořeněných rostlin v aklimatizační fázi. Rozhoduje silná a vyrovnaná stavba rostlin, dobře vyvinutá kořenová soustava a nadzemní část. U planých druhů hrachu dochází ke ztrátám jedinců již v perlitu, tzn. při přechodu ze zakořeňovacího média do podmínek, kde je snižena vlhkost a kde není zdrojem uhlíku cukerná složka média. Zálivku perlitu představuje MS médium (Murashige a Skoog, 1962) v poloviční koncentraci.

Graf 1: Hodnocení frekvence zakořenění do 50 % a nad 50 % rostlin u planých druhů hrachu v perlitu a v substrátu (hodnoceno jako % rostlin zakořeněných).



Dopěstování rostlin regenerovaných z *in vitro* podmínek (**obrázek 8**) se provádí v komerčním pěstebním substrátu (doporučené složení je rašelina, kůrový humus, jíl a písek, pH 6–7, bohatý na NPK živiny, odlehčeno perlitem) v místnosti s definovanými podmínkami růstu jako je teplota 20 ± 2 °C a světelný režim 16h den s intenzitou $56 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Popínavý vzrůst rostlin odpovídá planým formám genotypů a dosahuje výšky v rozmezí 60–100 cm, malý vzrůst rostlin se vyskytuje u *P. koernickei* (**obrázek 8A,B** vpravo).



Obrázek 8: Aklimatizace rostlin (A), kvetoucí aklimatizované rostliny (B) a tvorba lusků a semen (C).

Tvar a charakter lusků je rozdílný v závislosti na genotypu (**obrázek 8C**). U planých druhů hrachu *P. sativum* ssp. *elatus*, *P. dinocarpum* na luscích vznikají neoplazmata, morfologické výrůstky. Úspěšnost dopěstování převedených rostlin v řízených podmínkách růstu se vyhodnocuje počtem získaných semen na lusk a rostlinu.

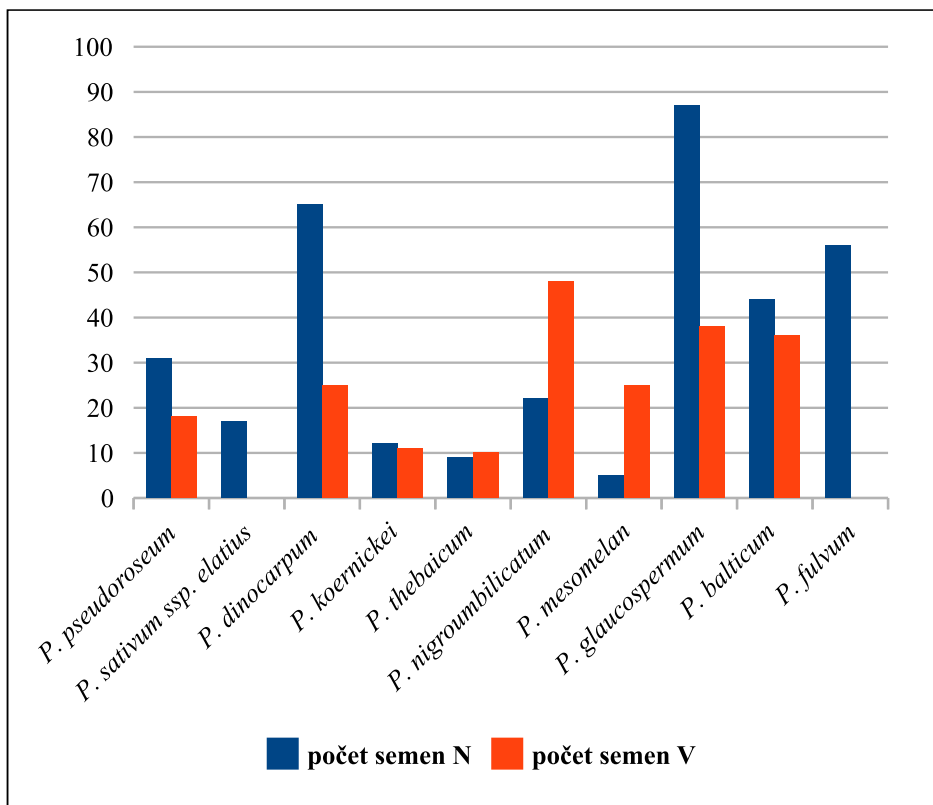
4.2 TVORBA OSIVA

V pěstebných komorách se dopěstují rostliny do semen. Tím se sleduje potomstvo odvozené ze MSC somaklonů primárních explantátů (V, N) jako počet semen získaných z opakovaného zakořeňování. Nasazenost lusků na jednotlivých rostlinách se liší mezi genotypy. U některých genotypů (př. *P. dinocarpum*) získané osivo nemusí odpovídat kvalitní produkci, část se musí vyřadit. Naopak u vysokých a popínavých typů planých druhů (*P. nigroumbilicatum*) se získá vysoká frekvence nasazenosti lusků a produkce semen. Získané osivo se využije pro další biotesty např. na stanovení odolnosti k fuzariózám. Významnější zdroj pro produkci semen

je nodální segment (N). Na výsledky má vliv počet převedených rostlin a počet semen na lusk. V porovnání s komerčními odrůdami se u planých druhů hrachu jedná o více výkonnější genotypy z pohledu *in vitro* reprodukce s výjimkou výkonného genotypu *P. sativum* var. *arvense* Arvika.

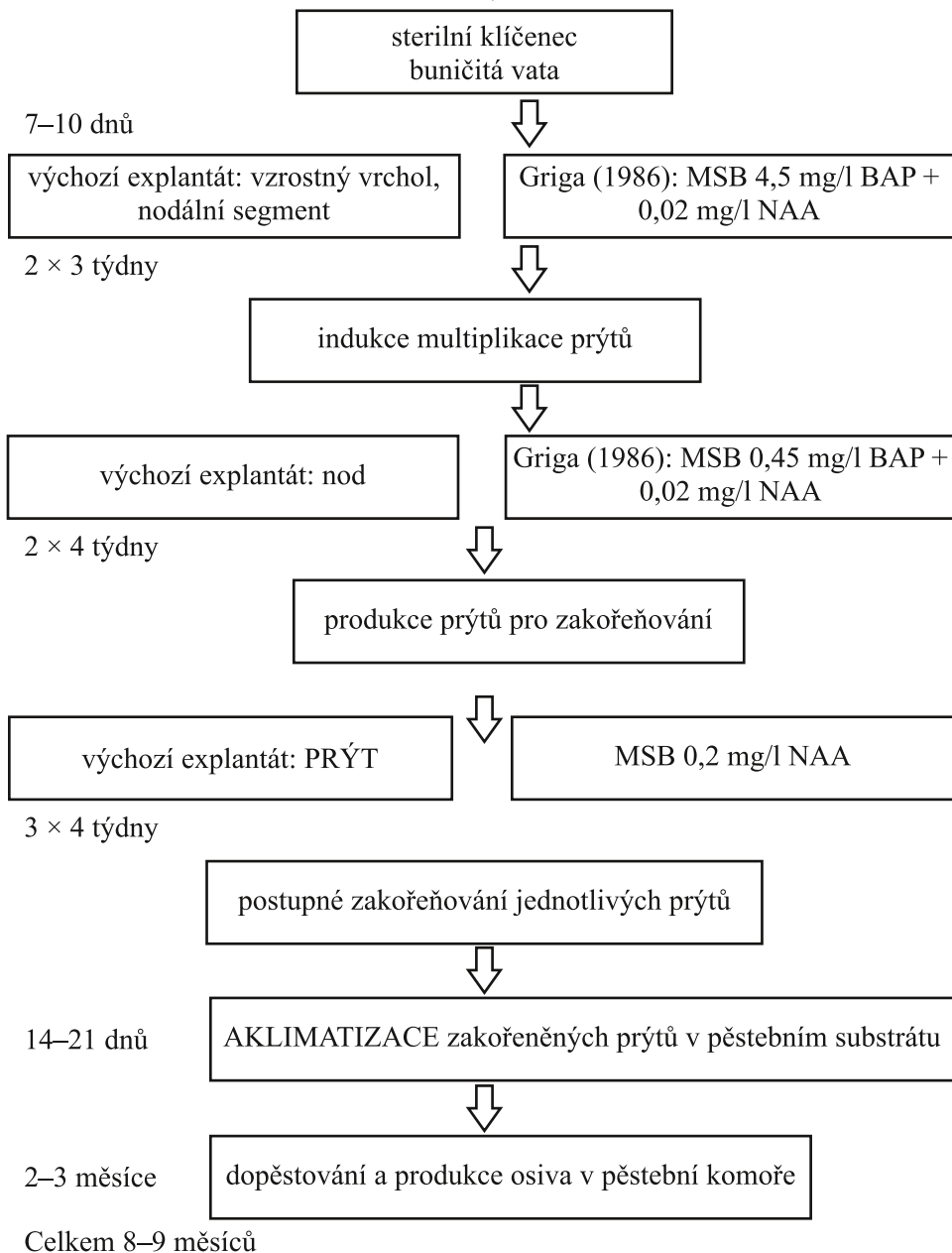
Využitelné systémy MSC, včetně zakořenění a aklimatizace, jsou popsány pro *P. pseudoroeseum*, *P. sativum* ssp. *elatius*, *P. dinocarpum*, *P. koernickei*, *P. thebaicum*, *P. nigroumbilicatum*, *P. mesomelan*, *P. glaucospermum*, *P. balticum* a *P. fulvum*. U planého hrachu *P. episcopi* dochází k tvorbě kalusu, a nedochází k zakořeňování. U planého druhu *P. abyssinicum* je problematické zakořeňování. Plané druhy hrachu *P. superfluens*, *P. capucinatorum* a *P. jomandii* nebylo možné zahrnout do úspěšné *in vitro* metodiky z důvodu neklíčivého osiva.

Graf 2: Produkce semen z *in vitro* převedených a dopěstovaných rostlin. Výchozí soubor 20 zakořeněných prýtů od každého genotypu.



5 SCHÉMA MIKROPROPAGACE HRACHU, ROD *PISUM*

5.1 HARMONOGRAM TVORBY MSC, *IN VIVO* REPRODUKCE MATERIÁLU



5.2 MIKROPROPAGAČNÍ SYSTÉMY

Přehled příkladů indukčních systémů v embryogenní nebo přímé organogenní mikropropagaci pro rod *Pisum*, publikovaných ve vědeckých článcích (**tabulka 3**).

Tabulka 3: Mikropropagační systémy pro hrách – přehled publikovaných protokolů (*zdroj Gatti a kol., 2016).

typ explantátu	genotyp/odrůda	indukční médium	zakořeňování	zdroj
somatická embryogeneze – <i>Pisum sativum</i> L.				
nezralá zygotická embrya	screening 46 genotypů, HM-6 linie	2,4-D	NAA nebo IBA	Stejskal a Griga, 1992
přímá organogeneze – <i>Pisum sativum</i> L.				
vzrostlý vrchol, úžlabní pupeny	Bohatýr	BAP+ NAA	NAA	Griga a kol. 1986;
děložní nod; dělohy	šlechtitelské linie a genotyp Afghánistán; genotypy HUDP-15 and IPF -99-25	BAP; BAP+NAA	NAA; IAA	Jackson a Hobbs 1990; *Rajput a Singh 2010
hypokotyl	Terese, Frisson, Solara	BAP, NAA, PIC;	NAA, IBA, IAA	Ochatt 2000
zygotická embrya	Santa Isabel	BAP		*Sanchez a Mosquera 2006
zralá semena	Espace	TDZ, BAP	IBA+NAA	*Zhahui 2009
Přímá organogeneze – plané druhy hrachu, rod <i>Pisum</i>				
děložný nod, vzrostlý vrchol	<i>P. fulvum</i> WL2140	BAP	není uvedeno	Knitl M, 2015
děložný nod, vzrostlý vrchol	<i>P. elatius</i> JI 1794	BAP	není uvedeno	Knitl M, 2015

6 ZÁVĚR

6.1 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Tato metodika byla vytvořena za účelem využití standardního biotechnologického postupu mikropropagace vytvořeného pro modelové odrůdy hrachu setého pro potenciální donory genů rezistence, tj. plané druhy hrachu. Metodika slouží jako základní postup pro přípravu dalších biotechnologických metodik, včetně protoplastových kultur a polyploidizace. Představuje tak základní postup pro regeneraci nových jedinců, umožňuje namnožení jedinečného materiálu, včetně hybridů. Pro tyto postupy bude metodika dále využita. Metodika stanovila specifické požadavky složení médií na úspěšnou regeneraci, včetně dopěstování rostlin u planých druhů hrachu.

6.2 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158.
- Gatti I, Guindón F, Bermejo C, Espósito A, Ciontry E (2016) *In vitro* tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: use and current status. *Plant Cell Tiss Organ Cult* DOI 10.1007/s11240-016-1082-6.
- Griga M, Tejkllová E, Novák FJ, Kubaláková M (1986) *In vitro* clonal propagation of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Org Tiss Cult* 6:95–104.
- Jackson AJ, Hobbs SLA (1990) Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of pea (*Pisum sativum* L.). *In vitro Cell Dev Biol* 26:835–838.
- Knitl M (2015) *In vitro* mikropopagace a protoplastové kultury u vybraných druhů čeledi Fabaceae. Diplomová práce, UPOL Olomouc.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473–497.
- Ochatt SJ, Mousset-Déclas C, Rancillac M (2000) Fertile pea plants regenerate from protoplasts when calluses have not undergone endoreplication *Plant Sci* 156:177–183.
- Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Gen Res*, 9:4–18.
- Stejskal F, Griga M (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pisum sativum* L. *Biol Plant* 34:15–22.

6.3 SEZNAM PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE

- Mikić MA, Smýkal P, Kenicer G, Vishnyakova M., Sarukhanyan N, Akopian JA, Vanyan A, Gabrielyan I, Smýkalová I, Sherbakova E, Zorić L, Atlagić J, Zeremski-Škorić T, Čupina B, Krstić D, Jajić I, Antanasović S, Đorđević V, Mihailović V, Ivanov A, Ochatt S, Toker C, Zlatković B, Ambrose M (2013) The bicentenary of the reserach on „beatiful“ vavilovia (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. *Bot. J. Linn Soc* 172:524–531.
- Mikić A, Smýkal P, Kenicer G, Vishnyakova M, Sarukhanyan N, Akopian JA, Vanyan A, Gabrielyan I, Smýkalová I, Sherbakova E, Zorić L, Atlagić J, Zeremski-Škorić T, Čupina B, Krstić D, Jajić I, Antanasović S, Đorđević V, Mihailović V, Ivanov A, Ochatt S, Toker C, Zlatković B, Ambrose M (2014)

- Beauty will save the Word, but will the Word save beauty? The case of the highly endangered *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Planta* 240:1139-1146, doi:1.1007/s00425-014-2136-9.
- Plačková L, Hrdlička J, Smýkalová I, Cvečková I, Novák O, Griga M, Doležal K (2015) Cytokinin profilig of long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Growth Regul* doi 10.1007/s10725-015-0044-z.
- Ochatt S, Conreux C, Smýkalová I, Smýkal P, Mikić A (2016) Developing biotechnology tools for „beautiful “vavilovia“ (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, doi 10.1007/s11240-016-1133-z.
- Šedivá J, Greplová M, Smýkalová I (2018) Creation of new genotypes of peas with the use of wild species and biotechnological methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 54: Suppl. 1, p.62–63, 2018. 14th Quadrennial Congress of IAPB, August 19th to 24th 2018, Dublin, Ireland.
- Smýkalová I, Šedivá J, Greplová M (2019) Biotechnological and breeding practices applied to wild pea species, including *Vavilovia formosa* L., to obtain new breeding materials. P103 Book of abstracts. 3rd Agriculture and Climate Change Conference, 24-26 March, 2019, Budapest, Hungary.

[illegible]

ISBN 978-80-87360-62-0

