FUNKČNÍ VZOREK

TH03030050-V003

Meriklon s vnesenými novými vlastnostmi

Výstup z projektu TH03030050: Tvorba nových genotypů hrachu s využitím planých druhů/forem a biotechnologických metod (2018 – 2021).

Smluvní strany

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

se sídlem Zemědělská 2520/16, 78701 Šumperk

34%

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.

se sídlem Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice

33%

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

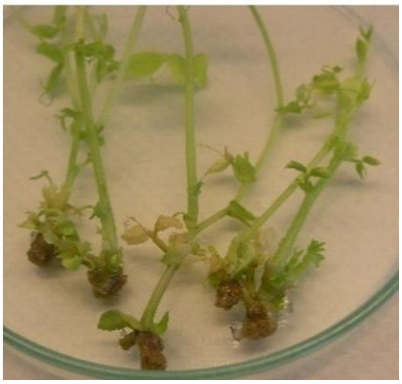
se sídlem Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod

33%

zasolení

sucho

těžké kovy



Vypracoval:

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.

Ing. Jana Šedivá, Ph.D.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Ing. Marie Greplová, Ph.D.

OBSAH

Obsah 3
Charakteristika funkčního vzorku 3
Podstata technického řešení 3
Předmět inovace řešení 4
Postup 4
In vitro testy – výběr médií, koncentrací testovaných faktorů..... 4
Biotesty založené na výběr koncentrace polyethylenglykolu PEG6000..... 4
Biotesty založené na výběr koncentrace NaCl..... 7
Biotesty založené na výběr koncentrace $Zn(NO_3)_2.6H_2O$..... 8
Charakteristika meriklonů s využitím obrazové analýzy 9
Charakteristika genotypů v *in vitro* kultuře pomocí flow-cytometrie 9
Charakteristika meriklonů na základě zvýšené exprese genů..... 10
Příklad využití 11
Aplikace s využitím kombinovaného stresu *in vitro* 11
Charakteristika meriklonů planých druhů..... 13
Charakteristika mutantních linií – šlechtitelské linie..... 15
Charakteristika meriklonů *Vavilovia formosa* 15
Charakteristika hybridů – nové materiály, vnesení nových vlastností..... 16
Závěr 18
Literatura 18

CHARAKTERISTIKA FUNKČNÍHO VZORKU

Jedná se o soubor meriklonů, který v selekčních podmínkách vykazuje toleranci nebo odolnost. Meriklony jsou charakterizovány reprodukčními vlastnostmi (*in vitro* a *ex vitro*). Původ materiálu vychází z genetických zdrojů, které byly využity k založení *in vitro* kultur mnohočetných prýtů (biotechnologický přístup, postupy uvedeny v certifikovaných metodikách Smýkalová a kol. 2019, Šedivá a kol. 2020). Charakteristika meriklonu (*in vitro*) spočívá v popisu morfologie, odolnosti prokázané v selekčních testech a *ex vitro* transferu včetně nasazování semen. Je charakterizována ploidie s využitím flow-cytometrie a charakteristika morfotypů nového materiálu s využitím molekulárních markerů.

PODSTATA TECHNICKÉHO ŘEŠENÍ

Meriklon je charakteristická kultura odvozená rozmnožováním *in vitro* kultur, nejčastěji řízkováním nebo dělením minitrsů (shluky prýtů). V rámci udržování genetického materiálu může v *in vitro* podmínkách docházet k somaklonální variabilitě, je proto nutné sledovat stabilitu materiálu vhodnými metodami, markerováním prostřednictvím známých genů, sekvencí. Aplikací biotechnologických metod *in vitro selekce* a screening na základě použitých markerů jsou ze souboru

meriklonů vybráni jedinci, kteří prokázali odolnost. Získané a charakterizované meriklony jsou využity v navazujícím výsledku Gfunk, kde je k dispozici jejich semenné potomstvo.

Odvozené *in vitro* kultury mnohočetných prýtů jsou zdrojem nových meriklonů - *in vitro* donorové kultury (certifikovaná metodika Smýkalová a kol. 2019).
Plané druhy hrachu: *P. pseudoroseum* (1)*, P. elatius* (2)*, P. dinocarpum* (5)*, P. glaucospermum* (6)*, P. koernickei* (7)*, P. thebaicum* (8)*, P. balticum* (9)*, P. nigroumbilicatum* (10)*, P. mesomelan* (11)*, P. abyssinicum* (12)*, P. fulvum* (13)*.* Pro srovnání jsou vybrány komerční odrůdy: *P. sativum* odrůdy Terno, Menhir, Arvika. Šlechtitelský materiál: embryogenní linie HM-6, mutanní a wt linie s pracovním označením W3-W6. Hybridní materiál: F2 č.6 *P. sativum* LG ASPEN x *P. glaucospermum* a F2 č.8 *P. sativum* King Fisher x *P. thebaicum.*

Popisný systém pro charakteristiku meriklonů – využití OA
Pro posouzení velikosti a tvaru listů v MSC *in vitro* kulturách a sledování fenotypové variability v podmínkách *in vitro* je využita metoda obrazové analýzy (OA, image analysis IA). Odstřižené listy jsou položeny na agarové plotny tak, aby byly objekty dostatečně reprezentativní. Ke snímání lze využít fotoaparát se stativem nebo snímací systém, který zároveň ukládá data do PC a archivuje jednotlivé snímky. Ke zpracování obrazu se využije dostupný software, př. NIS Elements AR verze 5.20.01 (Laboratory Imaging, Prague, Lt.D.)

Markerovací systém – popis
Vyhledávání vhodných markerů je založeno na *in vitro* selekcích, kde lze meriklony a somaklony testovat v různých zátěžových režimech, jedná se o abiotické druhy stresu. Například projevem nedostatku vody v rostlině je produkce ROS a vznik oxidativního stresu. Vybrané molekulární markery jsou kandidátní geny, obecně zapojené do odezvy rostlin na sucho. Proto jsou vybrány geny na ABA závislé – AREB; geny na ABA nezávislé – DREB, LEA a geny exprimující se při zvýšeném oxidativním stresu – kataláza (CAT). Po dvou týdnech opakované kultivace na těchto médiích se odeberou listy a z nich je pomocí standartních kitů izolována RNA. RNA je ošetřena DNázou. RNA je přepsána do cDNA a následně provedena qPCR pomocí navržených primerů. Izolace RNA z explantátů (směsný vzorek 100 mg ± 10 mg ze všech meriklonů obsažených v jedné baňce) probíhá dle instrukcí výrobce kitu. RNA je před dalším zpracováním ošetřena DNázou. Kvalita RNA je ověřována na 1% agarózovém gelu.

PŘEDMĚT INOVACE ŘEŠENÍ

V rámci biotechnologických metod a jejich využití u luskovin, zejména genetických zdrojů a šlechtitelského materiálu u hrachu nejsou dosud dostupné pro šlechtění meriklony, prokazující odolnost vůči vybranému druhu stresu. V případě nových postupů je zařazen markerovací systém, založený na rozdílné expresi známých genů, s cílem ověřit zvýšenou odolnost v souboru odrůd a linií hrachu a vybrat systém markerování v *in vitro* podmínkách.

POSTUP

***In vitro* testy – výběr médií, koncentrací testovaných faktorů**
Ze souboru genetického materiálu ve formě meriklonů, byly založeny selekční *in vitro* testy na sledování morfogenní a růstové reakce. Jednonodální segmenty z prýtů (**Obrázek 1.**) byly vybrány a použity k založení *in vitro* selekčních testů na výběr koncentrace PEG6000, Zn^{2+} a NaCl. Základní kultivační médium je MSB0 (**Tabulka 1.**).

Obrázek 1. Vstupní rostlinný materiál pro *in vitro* selekce, vyhledávání markerovacího systému v podmínkách abiotického stresu a odolných meriklonů.

Prýt použitý k ořezání nodálních segmentů	Nodální segment

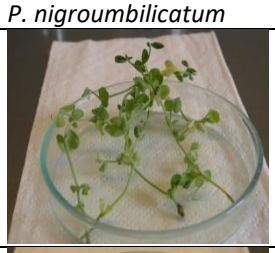
Tabulka 1. Složení kultivačního média pro tvorbu mnohočetných prýtů, základní makroprvky a mikroprvky (Murashige a Skoog, 1962) a B5 vitamíny (Gamborg a kol., 1968).

makroprvky	**médium (mg / 1000 ml)**	**zásobní roztok (g / 1000 ml)**	**příprava odpipetovaný objem**
$CaCl_2$	332,02	6,64	komponenty postupně navažovat do kádinky, rozpouštět v destilované vodě do konečného objemu 1000 ml; aplikace **50 ml** zás. roztoku na 1000 ml média
KNO_3	1900,00	38,00	
$MgSO_4$	180,54	3,61	
KH_2PO_4	170,00	3,40	
NH_4NO_3	1650,00	33,00	
mikroprvky	**médium (mg / 1000ml)**	**zásobní roztok (mg / 1000 ml)**	**příprava odpipetovaný objem**
roztok A			
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	2,50	navážit, postupně přidávat do 100 ml destilované vody; aplikace **0,5 ml** zás. roztoku na 1000 ml média
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	2,50	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25	25,00	
KI	0,83	83,00	
roztok B			
H_3BO_3	6,20	62,00	navážit, postupně přidávat do 100 ml destilované vody, aplikace **5 ml** zás. roztoku na 1000 ml média
$MnSO_4.H_2O$	16,90	169,00	
$ZnSO_4.7H_2O$	8,60	86,00	
roztok železa			
Na_2EDTA	37,25	7,45 g	navážit, rozpustit zvlášť, smíchat, zahřát až roztok zežloutne; aplikace **2,5 ml** zás. roztoku na 1000 ml média
$FeSO_4.7H_2O$	27,85	5,57 g	
vitamíny	**médium (mg / 1000 ml)**	**zásobní roztok (mg / 100 ml)**	**příprava odpipetovaný objem**
nikotinová kys.	1,00	10,00	navážit, postupně přidávat do 100 ml destilované vody; aplikace **10 ml** zás. roztoku na 1000 ml média
pyridoxin HCl	1,00	10,00	
thiamin HCl	10,00	100,00	
ostatní složky			
myo-inozitol	100,00 mg	navážit, rozpustit zvlášť v 5 ml destilované vody; přidat k ostatním složkám media 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	

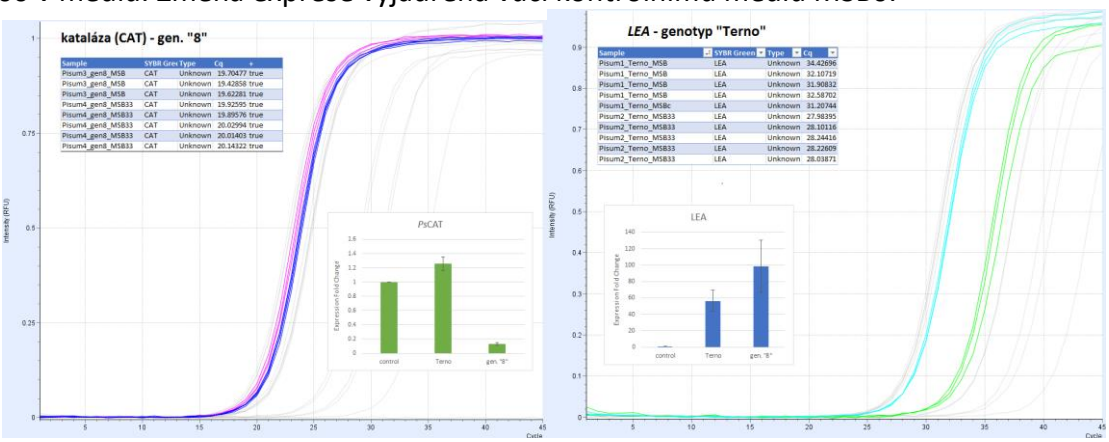
Biotesty založené na výběr koncentrace polyethylenglykolu PEG6000: 0; 33; 66; 99 g/l

Jedná se o výběr koncentrace polyethylenglykolu PEG6000 přidávaného do MSB0 média pro navození situace sucha pro rostliny jako stresující faktor. Při vyšších koncentracích již není možné docílit pevnosti kultivačního média. Aplikace PEG6000 má významný vliv na zmenšení velikosti listové plochy a růst explantátů (hlavní morfologické parametry) již při koncentraci 33 g/l. Růst kultur po 8 týdnech kultivace je vlivem aplikace PEG6000 významně omezen (**Tabulka 2**). Z výsledků sledování exprese dvou vybraných genů CAT a LEA (**Obrázek 2**) a rozdílné morfogenní reakce kultivovaných nodálních segmentů je zřejmé, že pro *in vitro* selekce můžeme použít opakovaně koncentraci 33 g/l PEG6000.

Tabulka 2. Vzhled kultur po 8 týdnech kultivace na MSB0 (kontrola), a na médiích s přídavkem 33 a 66 g/l PEG6000.

Médium	Hrách polní, komerční odrůda	Peluška, komerční odrůda	Planá forma, genové zdroje	Endemitní planý druh
	P. sativum Terno	*P. sativum* Arvika	*P. nigroumbilicatum*	*Vavilovia formosa*
MSB0				
MSB33				
MSB66				

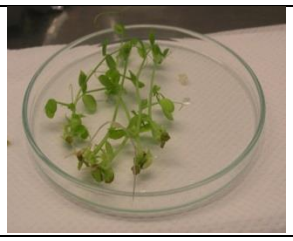
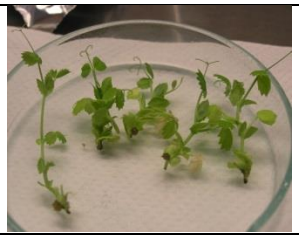
Obrázek 2. Rozdílná reakce genotypů *P. sativum* Terno a *P. thebaicum* (genotyp 8) na přítomnost PEG6000 v médiu. Změna exprese vyjádřená vůči kontrolnímu médiu MSB0.



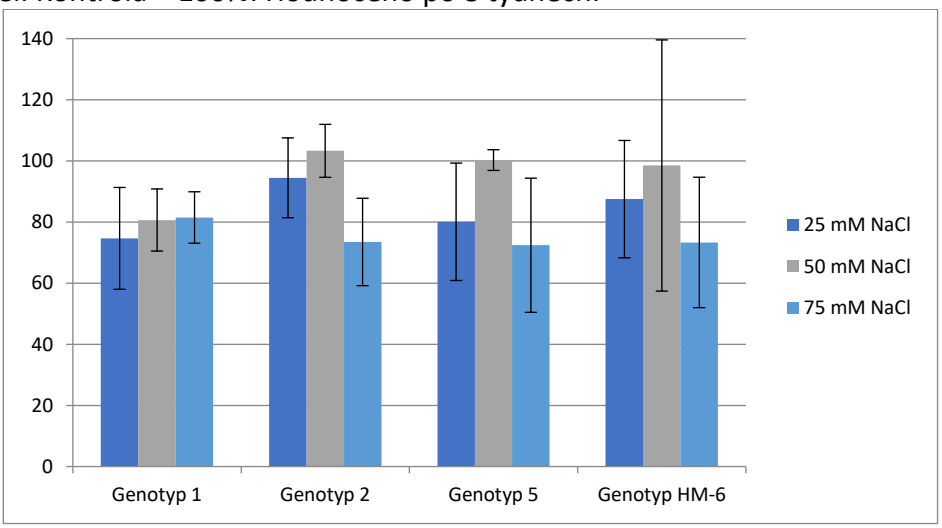
Biotesty založené na výběr koncentrace NaCl: 0; 25; 50; 75 mM (1,461; 2,922; 4,383 g/l)

Jedná se o výběr koncentrace NaCl přidávaného do MSB0 média pro simulaci podmínek růstu při zasolení. Po první pasáži (4 týdny kultivace na médiích s NaCl) jsou viditelné různé reakce genotypů na stres zasolením: bez vlivu, přes mírnou inhibici až po začínající chlorózy a inhibici růstu. Po 8 týdnech (ukončení selekce) jsou již zřetelné redukce růstu daná zkracováním internodií nebo tloustnutím stonků, zvětšení listové plochy, chlorózy a redukované větvení nebo naopak dlouživý růst. Příklady vzhledu kultur z kultivací explantátů na médiích uvádí **Tabulka 3**. Byl pozorován vliv na fotosyntetický aparát, začínající chlorózy. Z výsledků vyplývá, že dochází ke snížení sušiny explantátů vlivem přidané soli (**Obrázek 3.**). Byl stanoven stimulační vliv na produkci sušiny u koncentrace 50 mM NaCl v porovnání s nižší koncentrací 25 mM NaCl. Pro *in vitro* selekce v podmínkách zasolení lze použít i vyšší koncentrace NaCl. Reakce genotypu 1 (*P. pseudoroseum*) je odlišná od ostatních testovaných genotypů.

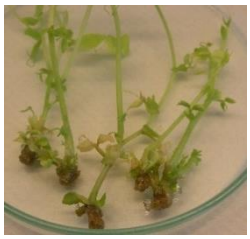
Tabulka 3. Vzhled kultur po 8 týdnech kultivace na MSB0 (kontrola), a na médiích s přídavkem 25 mM, 50 mM a 75 mM NaCl. Genotyp 1 - *P. pseudoroseum* a genotyp 2 - *P. elatius.*

	Kontrola	25mM NaCl	50mM NaCl	75mM NaCl
1				
	Kontrola	25mM NaCl	50mM NaCl	75mM NaCl
2				

Obrázek 3. Průměrná sušina explantátů (g), kultivovaných na médiu MSB0 s přídavkem 25, 50 a 75mM NaCl. Kontrola – 100%. Hodnoceno po 8 týdnech.

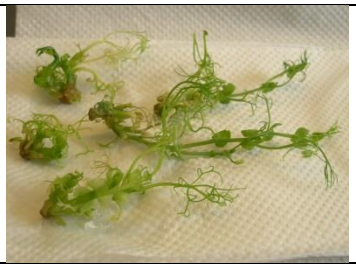
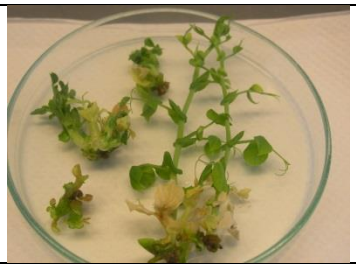
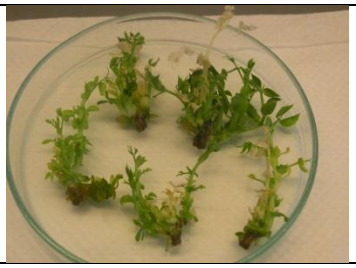
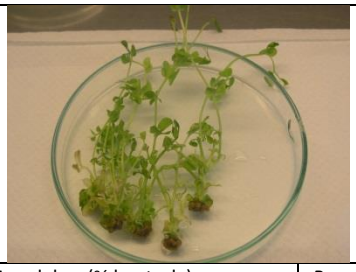
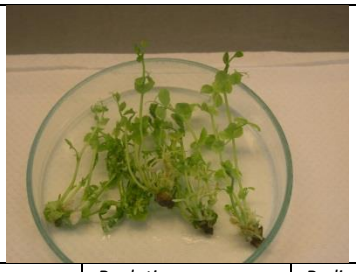


Biotesty založené na výběr koncentrace $Zn(NO_3)_2.6H_2O$: 0; 10; 100 mg/l



V případě selekcí *in vitro* s přídavkem zinku je nutné posuzovat dva faktory, tj. odezvu na růst: sušina, počet prýtů, jejich délka, počet vytvořených nodů apod., eventuálně morfologii (**Tabulka 4.**) a odezvu stresoru, vytvořenou sušinu (g) a koncentraci těžkého kovu v sušině prýtů (**Obrázek 4.**).

Tabulka 4. Vzhled kultur po 8 týdnech kultivace na MSB0 (kontrola) a na médiích s přídavkem 10 a 100 mg/l $Zn(NO_3)_2.6H_2O$.

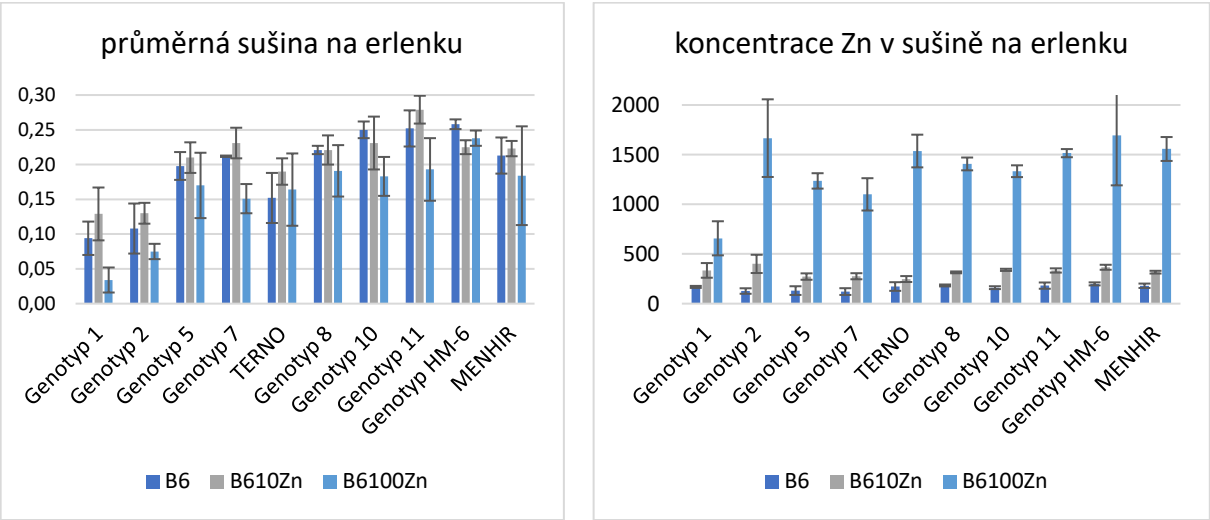
Kontrola – TERNO	10Zn – TERNO	100Zn – TERNO
		
Kontrola – HM-6	10Zn – HM-6	100Zn – HM-6
		
Kontrola – *P. thebaicum*	10Zn – *P. thebaicum*	100Zn – *P. thebaicum*
		

Zn selekce (% kontroly)		*P. pseudoroseum*	*P. elatius*	*P. dinocarpum*	*P.koernickei**	*P.sativum* TERNO
10 mg/l Zn	délka prýtu	97	101	83	105	155
	počet prýtů	37	88	87	169	105
	počet nodů	140	85	88	98	171
100 mg/l Zn	délka prýtu	59	61	79	105	83
	počet prýtů	45	42	87	132	90
	počet nodů	47	45	61	97	71
Zn selekce (% kontroly)		*P. thebaicum*	*P.nigroumbilicatum*	*P. mesomelan*	*P.sativum* MENHIR	*P.sativum* HM-6
10 mg/l Zn	délka prýtu	78	94	87	98	103
	počet prýtů	84	121	121	107	86
	počet nodů	112	83	83	116	119
100 mg/l Zn	délka prýtu	118	102	80	49	67
	počet prýtů	42	95	47	111	100
	počet nodů	55	68	42	47	128

Tolerance k Zn je patrná u genotypů HM-6 (embryogenní linie), dále u „původních“ komerčních odrůd TERNO a MENHIR a genotypů 8, 10 a 11 (dle deskriptorů v polních podmínkách červeno-

fialově kvetoucí a středně vzrůstný *P. thebaicum, P. nigroumbilicatum,* dle deskriptorů v polních podmínkách bíle kvetoucí a středně vzrůstný *P. mesomelan*). Lze konstatovat pozitivní vliv nižší koncentrace Zn a rovněž inhibiční vliv vyšší koncentrace Zn na růst explantátů, významný vliv genotypů na produkci sušiny a zakoncentrování Zn v pletivech a morfologii explantátů. Tento typ *in vitro* selekce lze využít pro získání odolných morfotypů planých druhů hrachu dlouhodobou kultivací na médiích se zvýšeným obsahem Zn v médiu. Růstová citlivost k zinku klesá v řadě: *P. elatius* > *P. pseudoroseum* > *P.mesomelan* > *P. dinocarpum* > *P.thebaicum* > *P.nigroumbilicatum* > *P. sativum MENHIR* > *P. sativum HM-6* (odolnější) > *P.sativum* TERNO > *P. koernickei* (nejodolnější). Průměrný obsah Zn u kontrolních variant činil 151,39±36,61 mg/kg sušiny. Aplikace 10 mg/l Zn vedla k průměrnému zvýšení obsahu v explantátech 287,86±98,98; po aplikaci 100 mg/l Zn téměř desetinásobné zvýšení, 1307,87±396,98 mg/kg sušiny.

Obrázek 4. Produkce sušiny (g) a koncentrace Zn v sušině (mg/kg) v závislosti na přidané koncentraci Zn^{2+} v médiu: 10 a 100 mg/l. Plané druhy hrachu *P. pseudoroseum* (1)*, P. elatius* (2)*, P. dinocarpum* (5)*, P. koernickei* (7)*, P. thebaicum* (8)*, P. nigroumbilicatum* (10)*, P. mesomelan* (11). Genotypy *P. sativum* odrůdy Terno, Menhir a šlechtitelská linie HM-6.



Charakteristika meriklonů s využitím obrazové analýzy

Charakteristiku meriklonů lze provést především na základě listové morfologie (Smýkalová a kol. 2019). V MSC kulturách různých planých forem lze pozorovat především celokrajnost nebo až pilovitost okraje listů. Tvarové variace listů i v rámci genotypu *in vitro* kulturách (**Tabulka 5. v příloze)** lze přisoudit vlivu kultivačních podmínek především na rozvoj listů. Vliv MSB0 média bez fytohormonů umožní sledovat drobné odchylky v morfologii mezi jednotlivými meriklony, včetně nežádoucích „kontaminací“. Sledováním vyrovnanosti listové morfologie v MSC kulturách můžeme usuzovat na stabilitu genotypu *in vitro*.

Charakteristika genotypů v *in vitro* kultuře pomocí flow-cytometrie

Stanovením ploidie listů nebo prýtů v *in vitro* kulturách lze zjistit stabilitu chromozomové sádky, případný výskyt mixoploidních meriklonů. V **Tabulce 6**. jsou uvedeny průměrné velikosti genomu u planých druhů a vybraných odrůd hrachu. Ve všech případech se jedná o diploidní stabilní materiál. Pokud se využije indukovaná polyploidizace, lze získat tetraploidní meriklony.

Tabulka 6. Stanovení ploidie u planých druhů hrachu.

č. vz.	název	CV %	mean	x=
Kontrola	*P. sativum* Protecta	5,14	211,78	2n
1	*P. pseudoroseum*	7,66	217,07	2,05 (2n)
2	*P. elatius*	7,38	209,40	1,98 (2n)
3	*P. dinocarpum*	6,36	191,92	1,81(2n)
4	*P. koernickei*	6,10	232,26	2,19 (2n)
5	*P. thebaicum*	10,65	231,87	2,19 (2n)
6	*P. nigroumbilicatum*	9,58	205,26	1,93 (2n)
7	*P. mesomelan*	7,54	232,40	2,19 (2n)
8	*P. sativum HM-6*	10,75	237,84	2,25 (2n)
9	*P. sativum* Menhir	8,38	212,85	2,01(2n)
10	*P. sativum* Terno	14,75	236,69	2,23 (2n)

Charakteristika meriklonů na základě zvýšené exprese genů

Sucho, ve fyziologickém pojetí, může být vyvoláno nejenom nedostatkem srážek, ale i zvýšenou salinitou půdy nebo i nekvalitní závlahou. Tento abiotický stres má dopad nejen na fyziologické procesy rostlin (zavírání průduchů, vadnutí, změny na úrovni buňky a cytoplazmy), ale i na expresi genů, které hrají úlohu v odpovědi na tento druh stresu. Produkty těchto genů pomáhají rostlině sucho překonávat. Dle způsobu zapojení produktů těchto genů do regulačních drah rostlin, se jedná o skupiny genů spojených s činností fytohormonu ABA a skupinu genů nezávislých na ABA. Dalším projevem nedostatku vody v rostlině je produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) a vznik oxidativního stresu. Proto byly vybrány geny na ABA závislé – AREB; geny na ABA nezávislé – DREB, LEA a geny exprimující se při zvýšeném oxidativním stresu – kataláza (CAT).

Hodnocení exprese vybraných genů je vyjádřena koeficientem zvýšení v případě aplikace stresu v kulturách *in vitro*, př. aplikace 33 g/l PEG6000 (**Tabulka 7.**). Zvýšená exprese genu LEA, pak DREB 2, 1 a nejméně genu CAT.

Tabulka 7. Průměrná exprese – koeficient byl získán jako násobek exprese genů u explantátů rostoucích na médiu s PE6000 33 g/l a z kontrolních médií (koeficient 1). Plané druhy hrachu *P. pseudoroseum* (1), *P. elatius* (2), *P. dinocarpum* (5), *P. koernickei* (7), *P. thebaicum* (8), *P. nigroumbilicatum* (10), *P. mesomelan* (11). Genotypy *P. sativum* odrůdy Terno, Menhir a šlechtitelská linie HM-6.

genotyp	**LEA**	**DREB1**	**CAT1**
P1	0,7	0,4	0,9
P2	3,6	0,7	11,0
P5	2,5	2,6	0,1
P7	1,6	1,3	0,2
P8	38,4	5,4	0,3
P10	0,5	2,6	0,2
P11	1,7	0,5	1,4
Menhir	2,4	2,4	0,2
Terno	3,9	3,8	0,5
HM-6	1,0	0,3	0,4

PŘÍKLAD VYUŽITÍ

Předpokládanými uživateli výsledku jsou firma Agritec, s.r.o., Šumperk, která využije meriklony k rozšíření zdrojů materiálu pro šlechtění a dále pracoviště zabývající se molekulární a biochemickou detekcí u *in vitro* materiálu (Chmelařský Institut, s.r.o., Žatec) a další subjekty zabývající se uchováváním meriklonů nebo genetického materiálu (Genové banky ČR). Vytvořený a charakterizovaný meriklon je v současnosti využit pro získání šlechtitelských linií po převodu do *ex vitro* podmínek, je dostupný ve formě semenného potomstva (aplikace Gfunk_V04).

Aplikace s využitím kombinovaného stresu *in vitro*

Selekce na základě rozdílné exprese genů souvisejících s oxidativním a osmotickým stresem. Výsledky jsou uvedeny v **Tabulce 8**. V případě stresu PEG+NaCl byla v obou opakováních (období 2020 a 2021) sledována zvýšená exprese genu **LEA** u genotypů P2, P11 a HM-6; zvýšená exprese **DREB 2** u genotypů P2 a HM-6; mírně zvýšená exprese genu **CAT** u genotypů genotyp 10 (pouze v roce 2020). V případě tendence stresu PEG přídavkem Zn (PEG+Zn) byla pozorována zmínění v obou opakováních (2020 a 2021): zvýšená exprese genu **LEA** u genotypů P2, P11 a Terno; zvýšená exprese genu **DREB 2** u genotypů P2 a HM-6; zvýšená exprese genu **DREB 1** u genotypu P2; mírně zvýšená exprese genu **CAT** u genotypů P8, P10, P11 a Terno (pouze v roce 2021).

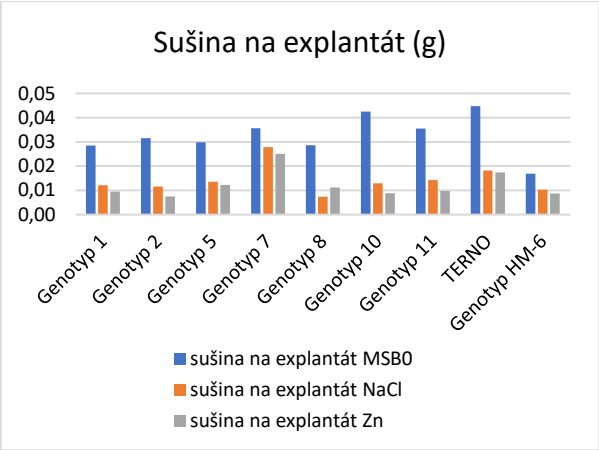
Opakovaně zvýšená exprese genů LEA, DREB 1 a DREB 2 u genotypů P2 (*P. elatius*) a P10 (*P. nigroumbilicatum*) u obou kombinovaných variant poukazuje na významnou aktivaci obraných mechanismů u těchto genotypů, kde předpokládáme odolnost. Za desetinásobkem příjmu Zn a zvýšenou expresí zejména LEA genu stojí i morfologický projev, *P. elatius* neboť je nejcitlivější vůči Zn i v růstových charakteristikách.

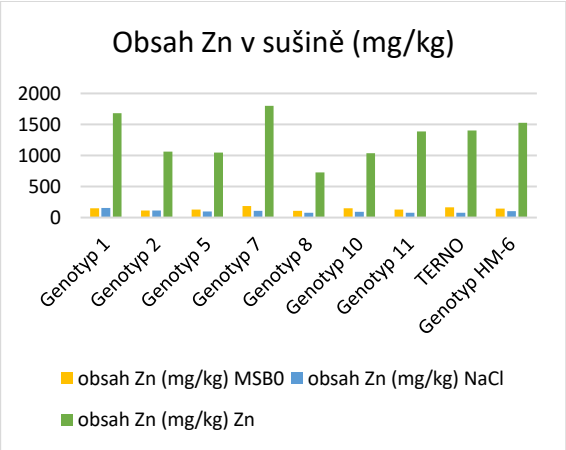
Tabulka 8. U vybraných genotypů exprese LEA, DREB 1 a DREB 2 v letech 2020 a 2021. Koeficient byl získán jako násobek exprese genů u explantátů rostoucích na médiích PE6000+NaCl (NaCl) nebo PEG6000+Zn^{2+} (Zn) a z kontrolních médií (koeficient 1). *P. elatius* (2), *P. thebaicum* (8), *P. nigroumbilicatum (10), P. mesomelan* (11), *P. sativum* Terno, *P. sativum* šlechtitelská linie HM-6.

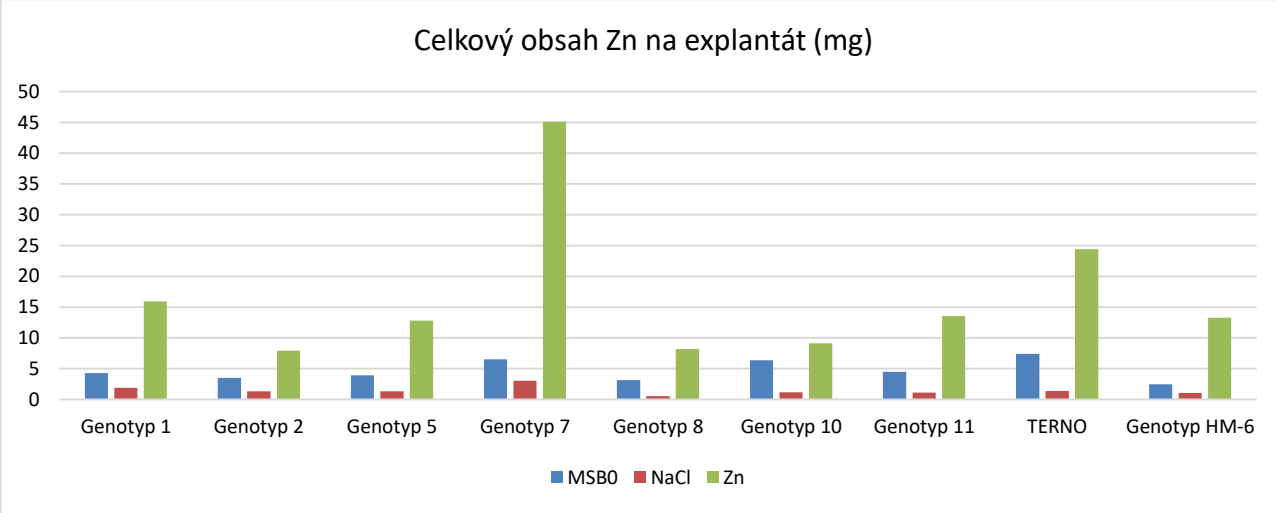
	LEA			
genotyp	**NaCl 2021_exprese**	**NaCl 2020_exprese**	**Zn 2021_exprese**	**Zn 2020_exprese**
P10/gen10	0.224±0.109	20.205±3.642	0.028±0.400	11.670±1.019
P11/gen11	1.540±0.061	4.456±0.551	6.751±0.293	10.795±2.186
P2/gen2	2.043±0.567	3.534±0.599	251.528±0.700	26.724±4.699
P8/gen8	0.071±0.198	6.701±0.755	0.510±0.145	3.378±0.367
Terno	10.067±0.233	0.662±0.417	3.009±0.569	1.372±0.371
gen. HM6	1.208±0.897	36.488±2.240	0.587±0.590	174.775±11.843
	DREB1			
genotyp	**NaCl 2021_exprese**	**NaCl 2020_exprese**	**Zn 2021_exprese**	**Zn 2020_exprese**
P10/gen10	0.121±0.055	0.331±0.008	2.249±0.198	0.795±0.085
P11/gen11	1.497±0.061	0.554±0.163	14.997±0.303	0.023±0.016
P2/gen2	1.006±0.157	0.938±0.083	29.233±0.061	2.981±0.109
P8	0.073±0.173	5.944±0.246	0.924±0.056	2.082±0.031
Terno	0.552±0.228	0.015±0.007	0.047±0.527	0.243±0.178
gen. HM6	0.745±0.506	16.243±0.816	0.440±0.286	16.088±1.855
	DREB2			

genotyp	NaCl 2021_exprese	NaCl 2020_exprese	Zn 2021_exprese	Zn 2020_exprese
P10/gen10	0.249±0.128	1.429±0.093	0.641±0.109	1.622±0.072
P11/gen11	2.019±0.227	0.302±0.013	9.81±0.297	0.134±0.014
P2/gen2	2.134±0.133	1.035±0.044	21.079±0.136	2.347±0.132
P8	0.232±0.090	1.642±0.060	0.908±0.082	0.921±0.077
Terno	3.712±0.212	0.277±0.126	0.932±0.533	0.104±0.067
gen. HM6	2.092±0.404	6.543±0.404	1.167±0.220	6.493±0.487
	CAT			
genotyp	NaCl 2021_exprese	NaCl 2020_exprese	Zn 2021_exprese	Zn 2020_exprese
P10/gen10	0.752±0.182	1.550±0.027	1.936±0.073	0.851±0.014
P11/gen11	0.967±0.066	0.168±0.004	1.508±0.287	0.145±0.002
P2/gen2	0.426±0.041	0.439±0.008	0.180±0.049	0.356±0.003
P8 /gen8	0.994±0.054	0.802±0.018	1.012±0.066	0.631±0.012
Terno	0.528±0.212	0.118±0.088	1.169±0.518	0.380±0.309
gen. HM6	0.540±0.535	0.771±0.054	0.476±0.128	0.671±0.036

Obrázek 5. Produkce sušiny explantátu (g), obsah Zn na explantát (mg) a koncentrace Zn v sušině (mg/kg) v závislosti na aplikaci: PE6000+NaCl (NaCl) nebo PEG6000+Zn^{2+} (Zn. Plané druhy hrachu: *P. pseudoroseum* (1), *P. elatius* (2), *P. dinocarpum* (5), *P. koernickei* (7), *P. thebaicum* (8), *P. nigroumbilicatum* (10), *P. mesomelan* (11), *P. sativum* Terno, *P. sativum* linie HM-6.







Genotyp P2 – *P. elatius* je odlišný od ostatních genotypů, se předpokládá existence přirozených mechanismů odolnosti, předpokládá se zvýšená exprese genů, která souvisí s oxidativním stresem. Drobný fenotyp, menší příjem Zn a přírůstky sušiny, zjevně i redukce růstu v obou případech kombinovaného stresu. A jak reaguje genotyp ve smyslu exprese? Velmi výrazně zvýšená exprese v porovnání s kontrolou (**Tabulka 8**) byla opakovaně zaznamenána u genu LEA zejména při PEG600 + Zn (kontrola má koeficient 1; Zn2020 má koeficient 26,7 a Zn2021 má koeficient 251). U stejné varianty je zaznamenána zvýšená exprese genu DREB 1 (2,9 a 29) a DREB 2 (2,5 a 21). Naopak Exprese genu CAT byla snížena. Vliv na výši exprese má dlouhodobá kultivace na médiích *in vitro* (vždy druhá uvedená hodnota). Tím se rovněž potvrzuje význam genů LEA a DREB1, 2 ve stresových podmínkách. Obsah sušiny na explantát po 8 týdnech kultivace na médiu bez stresorů činila v průměru 0,03 g. K obdobně významné redukci došlo vlivem všech induktorů stresu na výtěžek sušiny 0,01 g. Přesto byla zaznamenána jiná odezva na přítomnost zvýšené koncentrace Zn v médiu, kdy došlo k 10-ti násobnému zvýšení obsahu Zn v sušině explantátů. Příjem Zn byl ovlivněn, došlo k akumulaci jednak vlivem redukce sušiny a jednak i díky zvýšenému příjmu Zn. Aplikace PEG6000 + NaCl vedla k redukci příjmu Zn, redukci růstu a zvýšené expresi zejména LEA genu. Domníváme se, že nejvýznamnějším z vybraných markerů stresu je gen LEA a významnějším induktorem reakce na stres je kombinace PEG6000 + Zn. Tento genotyp je planý druh, u kterého se přepokládá regulace příjmu Zn v závislosti na intenzitě a druhu stresu.

P11 – *P. mesomelan* je další planý druh, kde byla zjištěna zvýšená exprese genu LEA, především při PEG600 + Zn (10,8 a 6,8). Sušina na explantát byla o něco vyšší než u P2, tj. 0,03 – 0,04 g. Redukce růstu a příjem Zn proběhly podobně jako u P2.

Standartní stará odrůda hrachu ***P. sativum* Terno** prokázala pouze mírně zvýšenou expresi genu LEA v přítomnosti PEG600 + Zn (1,3 a 3). U šlechtitelské, embryogenní **linie HM-6** se nepodařilo prokázat velmi razantně zvýšenou expresi LEA genu při opakování. Ačkoliv se nezdařilo potvrdit, přesto byla zvýšená exprese DREB2 genu při obou druzích stresu, PEG600 + Zn (6 a 1,1) a PEG6000 + NaCl (6 a 2). Zajímavý je pohled na sníženou expresi GREB 2 a CAT genů, zejména u **genotypu P8 - *P. balticum*.** U tohoto planého druhu hrachu došlo k amelioraci, potenciálně vylepšení odolnosti stresu suchem aplikací Zn v porovnání se zasolením, tento druh opět přijímá méně Zn.

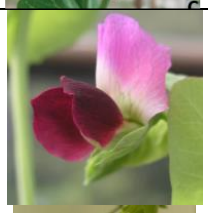
Obecně snížená exprese genu CAT při aplikovaných stresech, je značně rozkolísaná. U několika genotypů byla zaznamenána poměrně stabilní snížená odezva genu CAT na oba druhy stresu: u genotypu P 8, HM-6.

U genotypů P2 a P8 byly prokázány snížené příjmy Zn, přesto je exprese vybraných genů zejména u genotypu P2 vysoká.

Charakteristika meriklonů planých druhů

U nově vytvořených meriklonů planých druhů hrachu: *P. pseudoroseum* (1)*, P. elatius* (2)*, P. dinocarpum* (5)*, P. koernickei* (7)*, P. thebaicum* (8)*, P. nigroumbilicatum* (10)*, P. mesomelan* (11) zachycuje získané charakteristiky **Tabulka 9**.

Tabulka 9. Popisné morfologické a reprodukční charakteristiky meriklonů, včetně posouzení významnosti zvýšené exprese u vybraných genů LEA a GREB2, predikce odolnosti. *Počet semen získaných po dopěstování rostlin z MS systému z výchozích 20 explantátů. Významný vliv +++, střední vliv ++, mírný vliv +.

Č.	Název	Charakteristika květu	Reprodukce In vitro/ex vitro*/ zakořeňování	PEG	NaCl	Zn^{2+}	PEG+NaCl	PEG+Zn^{2+}
P1	*P. pseudoroseum*		2,0 prýtů a 4,77 nodů / 49 semen / 45 %	+++	+	+++	+	+
P2	*P. elatius*		1,6 prýtů a 7,4 nodů / 17 semen / 60 %	+++	+	+++	+++	+++
P5	*P. dinocarpum*		2,47 prýtů a 9,67 nodů / 90 semen / 20 %	+++	+	++	+	+
P7	*P. koernickei*		1,27 prýtů a 8,6 nodů / 23 semen / 22 %	+	+	+	+	+
P8	*P. thebaicum*		5,53 prýtů a 13,13 nodů / 19 semen / 51 %	++	+	++	+	+
P10	*P. nigroumbilicatum*		2,6 prýtů a 10,7 nodů / 70 semen / 44 %	++	+	++	+	+
P11	*P. mesomelan*		2,7 prýtů a 9,5 nodů / 30 semen / 46 %	+	+	++	++	++

V *in vitro* selekcích byl sledován vliv jednotlivých stresorů na růstové charakteristiky *in vitro* kultur:

Citlivost k PEG6000: Aplikace PEG6000 má významný vliv na zmenšení velikosti listové plochy a růst explantátů (hlavní morfologické parametry) již při koncentraci 33 g/l. Růstová citlivost (posouzení vzhledu kultur) klesá v řadě: *P. pseudoroseum* > *P. elatius* = *P. dinocarpum* = *P. thebaicum* = *P. nigroumbilicatum* = *P. mesomelan* > *P. koernickei* (nejodolnější).

Citlivost k NaCl: Byl stanoven stimulační vliv na produkci sušiny u koncentrace 50 mM NaCl v porovnání s nižší koncentrací 25 mM NaCl. Pro *in vitro* selekce v podmínkách zasolení lze použít i vyšší koncentrace NaCl. Mírná růstová odezva *P. pseudoroseum* je odlišná od ostatních testovaných genotypů.

Citlivost k Zn: Růstová citlivost k zinku klesá v řadě: *P. elatius* > *P. pseudoroseum* > *P.mesomelan* > *P. dinocarpum* > *P.thebaicum* > *P.nigroumbilicatum* > *P. sativum* MENHIR > *P. sativum* HM-6 (odolnější) > *P.sativum* TERNO > *P. koernickei* (nejodolnější).

V *in vitro* selekcích byl sledován vliv kombinace dvou faktorů na růstové charakteristiky *in vitro* kultuře:

Snížení příjmu Zn v přítomnosti PEG a NaCl, zvýšení příjmu Zn v přítomnosti PEG a Zn, málo akumulují Zn - genotyp č. 2 (*P. elatius*), č.8 (*P.balticum*) a č. 10 (*P. mesomelan*) a hodně akumulují Zn - genotyp č. 7 (*P. thebaicum*), č.1 (*P. pseudoroseum*) a HM-6.

Charakteristika mutantních linií – šlechtitelské linie

Posouzení vlastností, exprese genů, u mutantních linií a jejich rodičovských linií bylo založeno na výběru suchovzdorného materiálu. Mutantní linie W3 a rodičovská W4, dále pak mutantní linie W5 a rodičovská W6. Můžeme je porovnat v reakcích na stres prostřednictvím sledovaných genů, markerů na stres. Průměrné hodnoty koeficientů ze dvou opakování (období 2020, 2021).

Tabulka 10. Záznam zvýšené exprese u šlechtitelského materiálu, mutantních a wt linií hrachu (*P. sativum*).

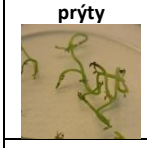
Zvýšená exprese	LEA NaCl	LEA Zn	DREB 2 NaCl	DREB 2 Zn	DREB 1 NaCl	DREB1 Zn
W3 AGT – 3mt	5,0±1,6	2,7±0,01	2,2±4,7			
W4 AGT – 3wt		4,2±2,8		2,7±0,1		
W5 AGT – 1mt	5,2±5,6	17,9±18,8	4,7±4,75	3,9±2,26		2,1±1,1
W6 AGT – 1wt	7,0±3,2	13,5±16,4	6,9±3,4	13,2±16,7	15,3±8,1	

Charakteristika meriklonů *Vavilovia formosa*

Byla vytvořena fenotypizace některých možných morfologických odchylek nebo typů z dlouhodobé MSC kultury *V. formosa*. Nejvýznamnější morfotypy jsou udržovány na MS nebo zakořeňovacích médiích. Vlivem indukované polyploidizace došlo k významným morfogenním změnám, zejména ke

ztloustnutí stonku a zvětšení listové plochy. Soupis možných morfotypů meriklonů je uveden v **Tabulce 11**.

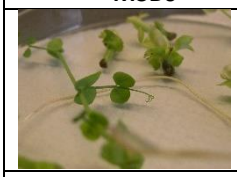
Tabulka 11. Tvorba morfotypů (1 - 8) u nových meriklonů *Vavilovia formosa* vlivem indukované polyploidizace.

1	2	3	4	5	6	7	8
kroucené prýty 	**robustní stonek**	**zakrslé až trpasličí**	**silnější stonky**	**velké listy**	**kratší internodia**	**dlouhé stonky**	**větvené stonky**
1 prodloužené	**2A** kratší internodia – kumulace, střední listy	**3A** zakrslejší a prorůstání úžlabních pupenů a drobné až střední listy	**4A** silnější stonky	**6C** větší listy	**6A** kratší internodia	**7** a slabé stonky	**8** a normální růst
3B kratší internodia a drobné listy	**5** velké listy	**4B** trpasličí	**4** a trpasličí	**8C** větší listy a normální růst	**6** a větší listy	**4E** delší a větvené uprostřed	**4C** a silnější kratší stonky
		4 trpasličí a silnější stonky	**4C** a kratší větvené	**6** větší listy a kratší internodia	**9** krátká kumulovaná internodia na bázi a střední listy	**4D** a větvené	**4E** větvené uprostřed a delší stonky
			8B a střední listy	**5** a robustní stonek	**8A** zkrácená internodia a větvené stonky	**6B** a málo větvené a střední listy	**4D** a dlouhé stonky
				9 střední listy a krátká kumulovaná internodia na bázi,			**6B** málo větvené dlouhé stonky a střední listy
				10 tmavě zelené střední listy a báze placatá = akumulace pupenů			
				8B střední listy a silnější stonky			
				2A a kratší internodia – kumulace a střední listy			
				6B střední listy a málo větvené dlouhé stonky			

Charakteristika hybridů – nové materiály, vnesení nových vlastností

Hybridní materiály ve štěpící F2 generaci jsou zdrojem morfologické a genetické variability. V generaci F2 lze nalézt znaky, které jsou ovlivněné křížením a zejména geneticky kódovanou dědičností (dominantní nebo recesivní znak). F2 generace *in vitro* je zdrojem variability morfotypů i v případě sledování reakcí na různé druhy stresů (**Tabulka 12.**).

Tabulka 12. Hybridní materiál vzniklý cíleným křížením moderních komerčních odrůd hrachu s planými druhy hrachu. Charakteristika materiálů v F2 generaci ve skleníkových a *in vitro* podmínkách. Reakce morfotypů v různých *in vitro* selekčních podmínkách indukovaného stresu včetně sledování vybraných genových markerů.

	křížení	**F2 hybrid 100% klíčivost**		
F2 č.6	***P. sativum* LG ASPEN x *P. glaucospermum*** světlý x světlý F1 hybrid 	bez antokyanové skvrny, bílý květ, vysoký, plodný, kvete později, později dozrává, nevětví / větví poměr 4/6, podlouhle vejčitý, celokrajný list, počet rostlin s úponky / bez úponků s listy odpovídá poměru 4/6 **F3 generace štěpení** Rostlina s úponky – krémová barva květu, bez skvrny, žlutozelená barva semene Rostlina bez úponků s listy – světle fialová barva květu, výrazná skvrna, světle hnědá fialově tečkovaná barva semene		
F2 č.6 *in vitro*	**Mikropropagační médium B6**	***Morfotypy***		
		dlouhé prýty, dlouhá internodia	dlouhé prýty, krátká internodia	listy celokrajné, špičaté
	MSB0	**NaCl**	**Zn**	
				
	LEA	5,383±0,246	47,215±0,415	
	DREB 1	0,337±0,261	1,101±0,442	
	DREB 2	0,819±0,288	0,945±0,411	
	CAT	0,525±0,245	0,255±0,410	

	křížení	**F2 100% klíčivost hybrid**			
F2 č.8	***P. sativum* KingFisher x *P. thebaicum*** světlý x tmavý F1 hybrid 	antokyanová skvrna, fialový květ, pozdější kvetení a zralost, vysoký / nízký vzrůst poměr 6/4, nevětví / větví poměr 2/8, podlouhle vejčitý, celokrajný, počet rostlin s úponky / bez úponků s listy opovídá poměru 5/5 **F3 generace štěpení** Tvar okraj lístku – celokrajný / řídce pilovitý Rostliny bz úponků s listy nebo s úponky - světle fialová barva květu, výrazná skvrna, šedozelená fialově tečkovaná barva semene			
F2 č.8 *in vitro*	**Mikropropagační médium B6**	***Morfotypy***			
		krátké prýty, krátká internodia	větvení v prvním nodu	drobné listy, celokrajné, do	dlouhý ztlustlý prýt, listy zubaté

				špičky, úponky	
	MSB0	**NaCl**	**Zn**		
	LEA	0,026±0,681	0,950±0,317		
	DREB 1	2,670±0,285	0,755±0,338		
	DREB 2	0,374±0,287	0,947±0,261		
	CAT	1,456±0,279	1,221±0,282		

ZÁVĚR

Funkční vzorek: „**Meriklon s vnesenými novými vlastnostmi**“ byl připraven na základě znalostí získaných při řešení navržených aktivit, jež jsou součástí projektu TH03030050. Experimentální poznatky byly využity k charakterizaci získaných meriklonů u hrachu. Jedná se o soubor metod, které lze využít k získání informací o odolnosti vůči suchu a zasolení (aplikace PEG6000 a NaCl) pro jednotlivé genotypy. Využitelný markerovací systém je založen na expresi genů, které obecně mají spojitost s oxidativními a osmotickými stresy (zvýšená exprese genů LEA, DREB1, DREB2 a snížená exprese genu CAT). Využitelnost připraveného funkčního vzorku byla ověřena v *in vitro* selekcích s MSC kulturami pro získání perspektivních materiálů, konkrétně u planých forem hrachu, F2 *in vitro* populace hybridních materiálů a šlechtitelských linií.

Literatura

Šedivá J. Greplová M., Smýkalová I.: Creation of new genotypes of peas with the use of wild species and biotechnological methods In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 14Th Quadrennial Congress of the IAPB, Dublin, Ireland 19th-28th August 2018, Congress Abstract Issue, Springer vol. 54 pp. 62-63, **2018**, ISSN 1054-5476, https://doi.org/10.1007/s11627-018-9927-9

Smýkalová I., Šedivá J., Greplová M.: *In vitro* multiplikační protokol planých druhů (forem) hrachu, rod *Pisum*. AGRITEC výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. ISBN 978-80-87360-62-0. 1.vydání, **2019.**

Smýkalová I, Šedivá J, Greplová M (2019) Biotechnological and breeding practices applied to wild pea species, including *Vavilovia formosa*, to obtain new breeding materials. 3rd Agriculture and Climate Change Conference, 24–26 March **2019**, Budapest Hungary, Book of Abstract, P103.

Šedivá J., Greplová M., Smýkalová I., Drahošová H.: Biotechnologické postupy pro rozšíření variability u luskovin. AGRITEC výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. ISBN 978-80-87360-64-4. 1.vydání, **2020.**