národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika in vitro kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití

Klíma, Miroslav; Vyvadilová, Miroslava; Kučera, Vratislav
2014

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-181084

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 28.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu
TAČR TA01010375
„Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého.“

Autoři:
Ing. Miroslav Klíma, Ph.D., Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.,
Ing. Vratislav Kučera, CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Praha-Ruzyně

Praha, září 2014

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Praha-Ruzyně

Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu
TAČR TA01010375
„Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého.“

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.
Ing. Vratislav Kučera, CSc.

Praha, 2014

Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití

Miroslav Klíma a kol.
klima@vurv.cz

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha-Ruzyně

Vypracováno za podpory projektu TAČR TA01010375
„Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého."

Oponenty metodiky byli:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ing. Petr Zehnálek, ÚKZÚZ ZS Hradec nad Svitavou

Podíl autorů na vypracování metodiky:
Ing. Miroslav Klíma, Ph.D. (40%),
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc. (30%),
Ing. Vratislav Kučera, CSc. (30%),

©Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2014
Foto: ©Klíma M.
Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-7427-168-7

Obsah

I. Cíl metodiky **6**

II. Vlastní popis metodiky **6**

II.1. Úvod **6**

II.2. Metodika přípravy a udržování donorových rostlin **6**

A) Pěstování v řízených podmínkách pro celoroční odběry explantátů 6

B) Pěstování ve skleníku ze sadby pro jarní odběry explantátů z ozimých odrůd 7

C) Pěstování ve skleníku pouze pro jarní a podzimní odběry explantátů 7

D) Pěstování v polních podmínkách pro časně letní odběry 7

II.3. Metodika zakládání prašníkových kultur **8**

Odběr poupat 8

Povrchová sterilizace poupat a odstranění vnějších obalů 8

Stanovení vývojové fáze pylu 8

Založení prašníkové kultury 9

II.4. Metodika regenerace celistvých rostlin a výběr homozygotních materiálů ... **9**

Regenerace celistvých rostlin 9

Převod do nesterilních podmínek 9

Přemnožení rostlin a výběr dihaploidů pro využití ve šlechtění 10

III. Srovnání novosti postupů **11**

IV. Popis uplatnění metodiky **11**

V. Ekonomické aspekty **12**

VI. Seznam použité související literatury **13**

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice **14**

VIII. Přílohy **15**

Tabulka 1. Složení kultivačního média A pro regeneraci z explantátů 15

Tabulka 2. Složení kultivačního média B pro regeneraci prýtů 15

Tabulka 3. Složení kultivačního média C pro růst prýtů a tvorbu kořenového systému 16

Obrázek 1. Výsev máku do hnízd do 80mm květníků 17

Obrázek 2. Prostřihávání na pět rostlin ve stádiu tří plně vyvinutých pravých listů 17

Obrázek 3. Prostřihávání na tři rostliny ve stádiu šesti plně vyvinutých pravých listů 17

Obrázek 4. Donorové rostliny ve 120mm květnících ve stádiu 12-14 pravých listů 17

Obrázek 5. Donorové rostliny v klimaboxu po přesázení do kontejnerů 190 × 190 mm 17

Obrázek 6. Donorové rostliny ozimých máků odebrané z polních podmínek. 17

Obrázek 7. Vývojová stádia poupat máku s ohledem na vhodnost odběru. 18

Obrázek 8. Vývojová stádia mikrospor. 19

Obrázek 9. Poupata různých délek a genotypů pro stanovení vývojového stádia mikrospor 20

Obrázek 10. Demonstrace nepřímé metody stanovení vývojového stádia mikrospor 20

Obrázek 11. Regenerace embryonálních struktur v prašníkové kultuře (médium A) 20

Obrázek 12. Regenerace prýtu v prašníkové kultuře (médium B) 20
Obrázek 13. Regenerace dobře vyvinutých prýtů na médiu B po přenesení na světlo 20
Obrázek 14. Prýty po odebrání z mateřského explantátu na médiu C 20
Obrázek 15. Listové růžice před pasážováním na kořenící médium C s IBA 21
Obrázek 16. Počátek regenerace kořenového systému z řezných ploch na médiu C s IBA 21
Obrázek 17. Rostlina s dobře vyvinutým kořenovým systémem připravená k výsadbě do Perlitu 21
Obrázek 18. Rostliny v minerálním substrátu (Perlit) tři týdny po výsadbě 21

I. Cíl metodiky

Mák setý (*Papaver somniferum*) je po řepce naší nejdůležitější olejninou. Při roční domácí spotřebě okolo 3 tis. t semen je naprostá většina produkce exportována a ČR je největším producentem máku pro potravinářské využití a určujícím nositelem jeho evropských i světových cen. Ačkoliv je mák plodinou se vzrůstajícím významem, je jeho výnos v dlouhodobém měřítku silně kolísavý a pro pěstitele tudíž rizikový. Relativně velké rezervy jsou také i v odrůdové skladbě. Chybí větší výběr odrůd máku vhodných do různých pěstebních podmínek ČR a omezená je také nabídka odrůd různých užitkových směrů. Ze škály zhruba šedesáti odrůd uvedených ve Společném (evropském) katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin se ve velkovýrobních podmínkách dají pěstovat jen některé. Při operativní tvorbě nových genotypů máku s požadovanými vlastnostmi se výzkum stejně jako u ostatních významných plodin zaměřuje na zavádění biotechnologických postupů do šlechtění. U máku setého byly doposud publikovány např. výsledky experimentů s buněčnými kulturami pro *in vitro* produkcí alkaloidů (Songstad *et al.* 1989, Williams *et. al.* 1992, 1996), selekcí kalusových linií (Khanna *et al.* 2005), se somatickou embryogenezí z buněk kalusů v explantátových kulturách (Wakhlu a Bajwa 1986, Ovečka *et al.* 1997a,b, Nabha *et al.* 1999), regenerací prýtů z izolovaných vajíček (Maheswari 1957), s indukcí somatických embryí (Wakhlu a Bajwa 1986), kalusů (Wakhlu a Bajwa 1987, Ovečka *et al.* 2000) a tvorbou dihaploidních regenerantů, získaných z nezralých pylových zrn (mikrospor) v prašníkových kulturách (Dieu a Dunwell 1988). Posledně jmenovaná metoda umožňuje vytvářet kompletně homozygotní genotypy z heterozygotních rodičů během jedné generace. Dihaploidní linie pak mohou být využity pro přímou tvorbu liniových odrůd s požadovanými parametry výkonu a kvality.

Cílem metodiky je podat ucelené informace o postupu tvorby dihaploidních linií máku setého ozimého i jarního typu z výchozích F_1 hybridů, od přípravy donorových rostlin, založení prašníkových kultur, regenerace celistvých rostlin až po převod regenerantů do nesterilních podmínek a jejich přemnožení.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Úvod

Níže uvedené metodické postupy jsou koncipovány tak, aby byly plně reprodukovatelné v prostředí šlechtitelských organizací, i bez nutnosti použití specializovaného přístrojového vybavení a analýz pro přesné stanovení vývojové fáze nezralých pylových zrn (mikrospor) a identifikaci dihaploidních regenerantů.

II.2. Metodika přípravy a udržování donorových rostlin

Při přípravě donorových rostlin se vychází ze čtyř základních schémat, která je možné aplikovat samostatně nebo kombinovat dle účelu použití a kapacitních nebo finančních možností:

A) Pěstování v řízených podmínkách pro celoroční odběry explantátů

- výsev osiva do hnízd po 10-20 ks do 80mm květníků dle klíčivosti semen (10 ks/genotyp, hloubka 5-8 mm) s výsevním rašelinným substrátem (obr. 1); je třeba zabránit přemokření substrátu, zejména v období od klíčení do fáze tří pravých listů

- kultivace v plně řízených podmínkách (teplota den/noc 15/12 °C, fotoperioda den/noc 9/15 hod., světelná intenzita 180 μmol/m^2/s – trubicové zářivky nebo sodíkové vysokotlaké výbojky); krátká délka dne a nižší teplota oddálí přechod do generativní fáze a poskytne čas pro napěstování rostlin s mohutnější listovou růžicí
- ve fázi 2-3 plně vyvinutých pravých listů prostříhání nůžkami na pět rostlin (obr. 2).
- ve fázi šesti plně vyvinutých pravých listů prostříhání na tři rostliny (obr. 3) a první přihnojení tekutým plným hnojivem dle obvyklého dávkování, jarovizace ozimých typů v jarovizační komoře 2 měsíce (teplota 2–5 °C, fotoperioda 8/16 hod., přisvětlování trubicovými zářivkami)
- přesazování i s kořenovým balem do 120mm květníků s rašelinným substrátem ve fázi 8 pravých listů, kdy se ponechá nejsilnější rostlina; další kultivace ve vytápěném a přisvětlovaném skleníku (v závislosti na ročním období), přihnojování ve 14-ti denních intervalech, nejdříve tři týdny po přesázení
- přesázení ve fázi 12-14 pravých listů (obr. 4) do kontejnerů 190 × 190 mm a umístění do kultivačních boxů (obr. 5) pro odběry na zakládání explantátových kultur (s řízenými teplotními a světelnými podmínkami (- teplota den/noc 18-22/12-14 °C, fotoperioda den/noc 16/8 hod., světelná intenzita 220 μmol/m^2/s - sodíkové výbojky), přihnojování roztokem plného tekutého hnojiva v 10-14-ti denních intervalech

B) Pěstování ve skleníku ze sadby pro jarní odběry explantátů z ozimých odrůd

- odběr sadby z polních výsevů v agrotechnické lhůtě v období prosinec-leden
- výsadba do 80mm květníků s rašelinným substrátem po 1 ks (větší rostliny) nebo do hnízd po 2-3 ks (menší, slabší rostliny, obr. 6)
- udržování ve vytápěném skleníku při teplotě 10-15 °C bez přisvětlování
- přesazování a ošetřování dle předchozí varianty, případné prostříhání na 1 rostlinu
- odběry explantátů v jarních měsících ve skleníku

C) Pěstování ve skleníku pouze pro jarní a podzimní odběry explantátů

- výsev ve fytotronu do hnízd (viz *A*) nebo přímo do vytápěného skleníku s přisvětlováním na začátku ledna (viz *A*) – jarní odběry; výsev a umístění do plně řízených podmínek – pro podzimní odběry; u ozimých typů se termín výsevu koriguje dle času, nutného pro jarovizaci (viz *A*)
- další pěstování a ošetřování dle *A* nebo *B*; nadměrné vytahování klíčenců při výsevu ve skleníku lze eliminovat kombinací snížené teploty (do 15 °C) a přisvětlováním sodíkovými vysokotlakými výbojkami při zachování krátkého dne (8-9 hod. světla)

D) Pěstování v polních podmínkách pro časně letní odběry

- výsev mořeného osiva na pole v agrotechnické lhůtě
- protrhání přehuštěných porostů
- ošetřování (choroby, škůdci), plečkování
- odběry poupat na zakládání explantátových kultur dle vývoje porostu a průběhu počasí; dobu kvetení donorových rostlin lze částečně prodloužit průběžným odstraňováním starších poupat a květů; poupata ze sekundárních a terciálních výhonů jsou obvykle menší (s menším počtem prašníků) a méně kvalitní

II.3. Metodika zakládání prašníkových kultur

Odběr poupat

- odběr uzavřených poupat s částí stopky (cca 5 mm) před a na počátku háčkování (poupě a květní stopka svírají úhel 0–120°, délka stopky mezi bází poupěte a palistem alespoň 5 mm, viz obr. 7); je třeba rozlišovat fázi počátku a konce háčkování, kdy poupě a stopka v určitém okamžiku svírají v obou fázích totožný úhel
- udržování poupat v cestovní chladničce v ledem chlazené kádince a jejich transport do laboratoře v co nejkratším možném čase, aby se předešlo dehydrataci
- přenos do laboratoře, udržování poupat v chladničce (5-8 °C) na navlhčené buničině (obr. 9); poupata spotřebovat v den odběru

Povrchová sterilizace poupat a odstranění vnějších obalů

- povrchová sterilizace poupat v laminárním boxu postřikem 70% etanolem (v/v), oschnutí poupěte na filtračním papíru (2-3 minuty)
- otevření poupěte pinzetami a odstranění kališních plátků; vyvarovat se dotyku vnějších částí kališních plátků a pinzet s okvětními plátky nebo prašníky; vyřadit poupata, do kterých vnikl roztok etanolu
- odříznutí okvětních plátků skalpelem
- odříznutí všech prašníků i se semeníkem u jejich báze (viz šipka na obr. 10) nově vysterilizovaným skalpelem do ledem chlazené Petriho misky pro stanovení vývojové fáze mikrospor

Stanovení vývojové fáze pylu

Nezralá pylová zrna, mikrospory, jsou schopny procházet embryogenezí pouze pokud je *in vitro* kultivace zahájena v určité fázi jejich vývoje – ve středně jednojaderném až časně dvojjaderném stádiu. Protože nebyl zjištěn těsný vztah mezi délkou poupěte a vývojovým stádiem mikrospor, stáří pylu je třeba u každého poupěte stanovovat individuálně až po odstranění kališních a korunních plátků ve sterilních podmínkách; při rutinních odběrech lze aplikovat dva způsoby:

A) Nepřímo - dle délky okvětních plátků a semeníku

- u poupat v optimálním vývojovém stádiu je rozdíl mezi délkou okvětních plátků a semeníkem (vč. blizny) přibližně 0-10 mm ve prospěch plátků (viz dvojitá šipka na obr. 10); prašníky by zároveň neměly svou délkou přesahovat okvětní plátky
- na bázi okvětních plátků poupat se staršími mikrosporami nebo zralým pylem je již patrná tmavá skvrna

Toto stanovení je pouze orientační, pro založení kultur a úspěšnou regeneraci je proto v tomto případě třeba od každého genotypu použít větší množství poupat z celého rozsahu výše uvedeného rozmezí.

B) Přímo – dle velikosti vakuoly v mikrosporách

- příprava roztlakových preparátů ve 13% roztoku (w/v) sacharózy z prašníků vyjmutých z poupat tří až čtyř stádií, dle rozdílu mezi délkou okvětních plátků a semeníku (viz způsob A)
- hodnocení vývojového stádia mikrospor pod mikroskopem při zvětšení 400× až 600×
- stanovení velikosti a lokalizace vakuoly v mikrosporách jednotlivých genotypů (převažující zastoupení středně až pozdně jednojaderných, případně časně dvojjaderných

mikrospor, které se vyznačují velkou vakuolou, vyplňující přes 50 % objemu mikrospory, viz obr. 8, stádia 1A až 3E)

Pro exaktní stanovení vývojového stádia je vždy nezbytná aplikace některé z barvicích technik, např. s použitím železitého acetokarmínu, aceto- nebo laktopropionorceinu, případně diamidin-fenylindolu (DAPI), a speciálního mikroskopu.

Založení prašníkové kultury

- kladení prašníků pinzetou na povrch pevného kultivačního média A (tab. 1) v 60mm nebo 90mm Petriho miskách po 8, resp. 20 ks; regeneraci ze somatických pletiv lze omezit odtržením nitky od prašníku a jeho umístěním na médium tak, aby nedošlo ke kontaktu jizvy nitky s médiem
- přemístění kultur do termostatu s vyšší teplotou (tma, 35 °C) na 24 hod. pro indukci embryogeneze
- snížení teploty na 25 °C
- po objevení embryonálních struktur (obr. 11) pasážování na médium B (tab. 2)
- po objevení prvních prýtů (obr. 12) přenos do kultivační komory (fotoperioda den/noc 16/8 h, intenzita 200 μmol/m^2/s, teplota 25 °C)

Detailní soupis potřebného vybavení pro udržování donorových rostlin, zakládání kultur, regeneraci a přemnožení rostlin je uveden v certifikované metodice Vyvadilová a kol. (2008).

II.4. Metodika regenerace celistvých rostlin a výběr homozygotních materiálů

Regenerace celistvých rostlin

- po zezelenání prýtů (obr. 13) přenesení kultur do kultivační komory s kratší délkou dne (9/15 hod.), nižší teplotou a intenzitou osvětlení (18 ± 2 °C, resp. 120 μmol/m^2/s)
- odříznutí prýtů nebo skupin prýtů ve fázi 3-5 listů a pasážování na pevné médium C bez růstových regulátorů ve 100ml Erlenmayerových baňkách po 4-6 ks (obr. 14)
- po dosažení stádia listové růžice (obr. 15) přepasážování prýtů bez kořenového systému po 1 ks na médium C s přídavkem indolylmáselné kyseliny (IBA) 4 mg/l pro inicializaci tvorby kořenového systému (obr. 16)

Převod do nesterilních podmínek

- vyjmutí rostlin s dobře vyvinutým kořenovým systémem (obr. 17) a odstranění zbytků média pod tekoucí vodou
- máčení kořenů v roztoku fungicidu (propamocarb, 1,2 g účinné látky na 1 litr roztoku) 30 minut
- přesázení rostlin do Perlitu v 80mm květnících, zálivka roztokem propamocarbu
- umístění do kultivačních boxů, zakrytí perforovanou fólií pro zachování vysoké vzdušné vlhkosti, fotoperioda krátkého dne, teplota ±18 °C, intenzita světla 80-100 μmol/m^2/s, pravidelná zálivka
- po 7 dnech postupné zvedání krytu, po 20-ti dnech jeho úplné odstranění (obr. 18)
- přihnojování ve 14-ti denních intervalech, nejdříve 10. den po vysázení do Perlitu
- po prokořenění výsadba do 120mm květníků s rašelinným substrátem; případná jarovizace a další ošetřování viz Příprava a udržování donorových rostlin

Přemnožení rostlin a výběr dihaploidů pro využití ve šlechtění

- před začátkem kvetení izolace celých rostlin nebo jednotlivých květů netkanou textilií resp. izolačními pytlíky, ošetřování proti houbovým chorobám a škůdcům
- sklizeň osiva z fertilních rostlin
- výsev jednotlivých přemnožených regenerantů v polních podmínkách v maloparcelkových pokusech dle standardní technologie pěstování máku
- zhodnocení uniformity potomstva jednotlivých regenerantů, přemnožení uniformních porostů v technické izolaci, zařazení do mezistaničních předzkoušek pro testy agronomických charakteristik

III. Srovnání novosti postupů

Předkládaná „Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití“ je aktuální a nová, protože poskytuje šlechtitelům ucelený přehled o metodách a postupech pro tvorbu dihaploidů s využitím *in vitro* kultivace v prašníkových kulturách. V současné době není v ČR k dispozici obdobná metodika, která by se tímto tématem u máku setého zabývala. Dostupné informace k této problematice jsou kusé, navíc se v převážné většině zabývají problematikou *in vitro* kultur z hlediska produkce morfinanových alkaloidů. Tento typ výzkumu je dlouhodobě doménou farmaceutických společností, tudíž jeho výsledky nejsou veřejně dostupné.

IV. Popis uplatnění metodiky

„Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití“ v první části zahrnuje několik variant přípravy a udržování výchozích donorových F_1 rostlin s ohledem na kapacitní, prostorové a finanční možnosti uživatelů (šlechtitelů). Zohledňuje i způsob přípravy výchozích materiálů jarního a ozimého typu z hlediska jejich požadavků na přechod do generativní fáze. V další části jsou pak představeny základní techniky a metody popisující odběr explantátů, zakládání prašníkových kultur, regenerace prýtů a celistvých rostlin, převod do nesterilních podmínek, přemnožení, identifikaci a výběr dihaploidních materiálů pro další šlechtění. Rovněž je přiloženo i kompletní složení používaných kultivačních médií; klíčové fáze procedur jsou pro názornost dokumentovány obrazovou přílohou.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze odvodit dihaploidní regeneranty máku setého z embryogenních kříženců máku F_1 generace. Výstupem jsou zcela homozygotní materiály, které lze po ověření fertility a nejvýznamnějších agronomických charakteristik v polních podmínkách (v mezistaničních předzkouškách) přímo zařadit do Státních odrůdových zkoušek. S využitím vhodných výchozích rodičů a jednorázové homozygotizace pylovou embryogenezí lze fixovat požadované rekombinace znaků prakticky v průběhu jednoho roku. Časová úspora tohoto postupu je zřejmá; další podstatnou výhodou je i genetická uniformita materiálů, která se pozitivně odrazí i na uniformitě fenotypové.

Uživatelé metodiky jsou šlechtitelé máku setého. Proto jsou výše uvedené metodické postupy koncipovány tak, aby byly plně reprodukovatelné na jejich pracovištích, i bez nutnosti použití specializovaného přístrojového vybavení a analýz pro přesné stanovení vývojové fáze nezralých pylových zrn (mikrospor) a identifikaci dihaploidních regenerantů. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy OSEVA PRO s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

V. Ekonomické aspekty

Využití *in vitro* regenerace u máku setého přinese výrazné zefektivnění šlechtitelského procesu u této plodiny. Značným přínosem je zkrácení doby nutné k vytvoření materiálů s dostatečnou úrovní homozygotnosti. Tradičními šlechtitelskými postupy založenými na opakovaném samosprašování trvá tvorba liniového materiálu máku dostatečně geneticky stabilního, aby mohl být přihlášen do státních odrůdových zkoušek, minimálně 8 – 10 let. Díky aplikaci uvedené metodiky může být tento proces reálně zkrácen na 5 let. Odpadá tak udržování raných šlechtitelských generací a s tím spojené náklady. Náklady na vedení jedné šlechtitelské linie rané generace (F1 až F4) můžeme ročně předpokládat cca 1000 Kč při každoročním počtu materiálů těchto generací cca 400 (aktuální stav OSEVA Pro, s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava) by zavedení metodiky uspořilo ročně 400 tis. Kč. Uvolněné kapacity mohou být následně využity k rozšíření tvorby nových genotypů, což významně zvyšuje pravděpodobnost registrace nové odrůdy.
Metodou tvorby DH je zajištěna 100% homozygotizace. Takto vysoké hodnoty se prakticky nedá žádnou jinou metodou dosáhnout. Je tak zajištěna genetická čistota odrůdy, kvalita a naprostá stálost v čase. Zvláště u máků bývají častým problémem podmínky testu uniformity, odlišnosti a stálosti odrůdy, které jsou součástí registračního odrůdového řízení. Zavedením metodiky bude dosaženo vytvoření zcela ustálených linií bez rizika nesplnění parametrů registračního řízení.

Náklady spojené s aplikací metodiky lze rozdělit do dvou skupin; na fixní náklady, související s pořízením a odpisy kultivačních komor a přístrojového vybavení, koupí nebo pronájmem pozemků, mzdami kmenových pracovníků apod., a na náklady variabilní, jako je např. spotřeba energií, materiálu a úkolových mezd personálu.
Nezbytným vybavením je specializovaná kultivační komora(-y) s řízeným světelným a teplotním režimem (250 tis. – 1 mil. Kč), laminární box pro práci v aseptickém prostředí (150-300 tis. Kč), autokláv pro přípravu kultivačních médií a sterilizaci nástrojů (70-120 tis. Kč), biologický termostat (30-200 tis. Kč), analytické váhy (20-100 tis. Kč), přístroj pro přípravu deionizované vody (20-60 tis. Kč), laboratorní vařič (10-30 tis. Kč), magnetická míchačka (10-20 tis. Kč), předvážky (5-10 tis. Kč), nástroje pro dávkování kapalin (3-5 tis. Kč) a pH metr (2-10 tis. Kč). V případě udržování donorových rostlin v řízených podmínkách, resp. dopěstování a přemnožení rostlin ve skleníku je třeba kalkulovat i pořízení další kultivační komory (300 tis. – 1 mil. Kč), resp. skleníku. Předpokládá se, že uživatelé metodiky již mají částečně nebo kompletně vybavenou laboratoř explantátových kultur, potřebné kultivační komory a zaškolený personál.
Významnou položkou nákladů variabilních je spotřeba elektrické energie na provoz osvětlovacích těles kultivačních boxů a chlazení na požadovanou teplotu. Na jednu donorovu rostlinu máku je třeba počítat s příkonem 15-20 W (sodíková výbojka), na rostlinu *v in vitro* podmínkách 1,5-2,0 W (lineární zářivka). Náklady na chlazení se odvíjejí od způsobu odvodu přebytečného tepla (odsávání, izolace osvětlovacích těles od prostoru s rostlinami apod.). Náklady na přípravu kultivačních médií (250-600 Kč /l média) souvisí s kvalitou (čistotou) výchozích chemikálií a složením jednotlivých typů médií. Výsledné jednotkové náklady na produkci požadovaných rostlinných materiálů výrazně ovlivňují i další faktory, jako je fyziologický stav donorových rostlin v průběhu odběrů, regenerační schopnost použitých genotypů, výskyt kontaminací aj. K dalším významným nákladovým položkám patří i např. výdaje spojené s periodickou údržbou a revizí přístrojového vybavení apod.

VI. Seznam použité související literatury

Dieu P., Dunwell J.M. (1988): Anther culture with different genotypes of opium poppy (*Papaver somniferum* L.): Effect of cold treatment. Plant Cell Tissue And Organ Culture 12: 263-272.

Khanna R., Mathur A.K., Mehrotra N.K. (2005): Selection of 3-fluorotyrosine tolerant callus lines in two cultivars of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) and regeneration of plants through somatic embryogenesis. Current Science 88: 274-280.

Maheshwari N. (1957): In vitro Culture of Excised Ovules of *Papaver somniferum*. Science 127: 342.

Nabha S., Lamblin F., Gillet F., Laurain. D, Fliniaux M., David A., Jacquin A. (1999): Polyamine content and somatic embryogenesis in *Papaver somniferum* cells transformed with sam-1 gene. J Plant Physiol 154: 729-734.

Ovečka M., Bobák M., Blehová A., Krištín J. (1997a): *Papaver somniferum* regeneration by somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Biologia Plantarum 40: 321-328.

Ovečka M., Bobák M., Šamaj J. (1997b): Development of shoot primordia in tissue culture of *Papaver somniferum* L. Biologia Plantarum 39: 499-506.

Ovečka M., Bobák M., Šamaj J. (2000): A comparative structural analysis of direct and indirect shoot regeneration of *Papaver somniferum* L. in vitro. Journal of Plant Physiology 157, 281-289.

Songstad D. D., Giles K. L., Park J., Novakovski D., Epp,D., Friesen L., Roewer I. (1989): Effect of ethylene on sanguinarine production from *Papaver somniferum* cell cultures. Plant Cell Reports 8: 463-466.

Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V. 2008: Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 28 pp.

Wakhlu A. K., Bajwa P. S. (1986): Regeneration of uniform plants from somatic embryos of *Papaver somniferum* (opium poppy). Phytomorphology 36: 101-106.

Wakhlu A. K., Bajwa P. S. (1987): Cytological analysis of embryogenic callus cultures and regenerated plants of *Papaver somniferum* L. (opium poppy). Cytologia 52: 631-638.

Williams R. D., Bedard C., Williams, Chavarie C., Archambault J. (1996): Production of sanguinarine by elicited plant cell culture: II. Further nutritional aspects. Journal of Biotechnology 46: 107-120.

Williams, R. D., Chauret N., Bedard C., Archambault J. (1992): Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *Papaver somniferum* cell cultures. Biotechnology And Bioengineering 40: 971-977.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Klíma M., Hilgert A., Urban M. (2014): Regenerace celistvých rostlin máku setého (*Papaver somniferum* L.) v *in vitro* kulturách. Úroda, Vědecká příloha 12/2014: 199-202. ISSN 0139-6013

Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V. (2004): Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. Horticultural Science (Prague) 31: 119-123.

Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V. (2008): Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44: 30-36.

Kučera V., Vyvadilová M., Klíma M. (2007): Využití dihaploidního systému ve šlechtění ozimé řepky (*Brassica napus* L.). Úroda 55: 197-203.

Smýkalová I., Větrovcová M., Klíma M., Macháčková I., Griga M. (2006): Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project "Czech Winter Rape". Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 42: 58-71.

Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V. (2001): Embryogenic responsibility of *Brassica oleracea* vegetables in a microspore culture. Horticultural Science (Prague) 28(4): 121-124.

Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V. (2008): Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 28 pp.

Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V., (1998b): Analysis of factors affecting embryogenesis in microspore cultures of some cruciferous vegetables. Zahradnictví - Hort. Sci. (Prague) 25: 137-144.

Vyvadilová M., Kučera V., Tomášková D. (1998a): Embryogenesis in isolated microspore cultures in different genotypes of *Brassica oleracea*. Zahradnictví - Hort. Sci. (Prague) 25: 9-14.

VIII. Přílohy

Tabulka 1. Složení kultivačního média A pro regeneraci z explantátů (upraveno dle Dieu a Dunwell 1988)

Anorganické komponenty	mg/l média	*Organické komponenty*	mg/l média
NH_4NO_3	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO_3	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
$CaCl_2 . 2 H_2O$	440,000	Thiamin	0,100
$MgSO_4. 7 H_2O$	370,000	Glycin	2,000
KH_2PO_4	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H_3BO_3	6,200	Sacharóza	30 g/l
$MnSO_4. 4H_2O$	22,300	Agar	8 g/l
$ZnSO_4. 7 H_2O$	8,600	*Růstové regulátory*	
$Na_2MoO_4. 2 H_2O$	0,250	2,4-D	2,000
$CuSO_4. 5 H_2O$	0,025	IAA	0,500
$CoCl_{2.} 6 H_2O$	0,025	BAP	0,500
$FeSO_4 . 7 H_2O$	27,800	Kinetin	1,000
$Na_2 . EDTA . 2 H_2O$	37,300	pH	5,8 – 6,0

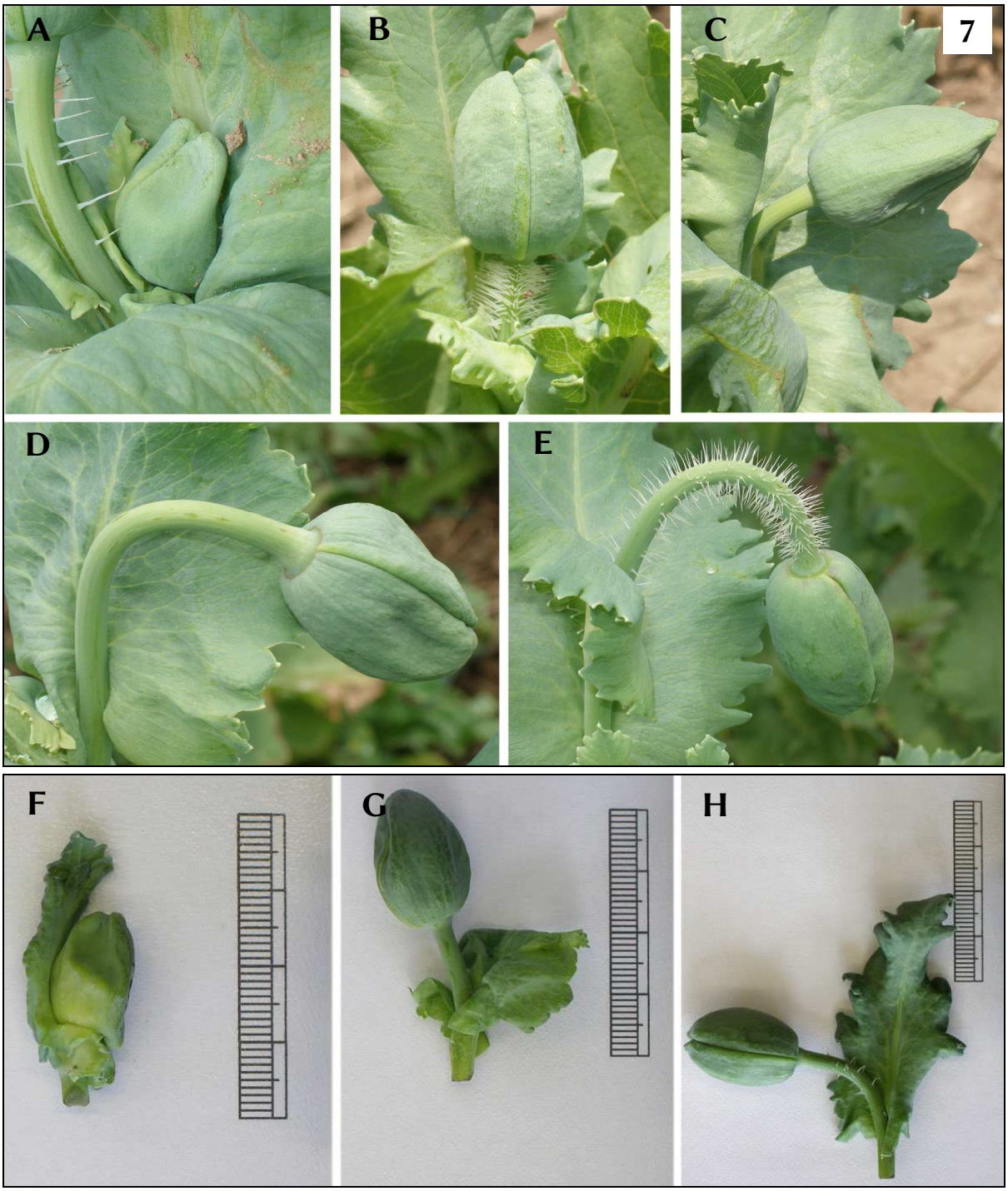
Tabulka 2. Složení kultivačního média B pro regeneraci prýtů (upraveno dle Dieu a Dunwell 1988)

Anorganické komponenty	mg/l média	*Organické komponenty*	mg/l média
NH_4NO_3	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO_3	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
$CaCl_2 . 2 H_2O$	440,000	Thiamin	0,100
$MgSO_4. 7 H_2O$	370,000	Glycin	2,000
KH_2PO_4	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H_3BO_3	6,200	Sacharóza	20 g/l
$MnSO_4. 4H_2O$	22,300	Agar	10 g/l
$ZnSO_4. 7 H_2O$	8,600		
$Na_2MoO_4. 2 H_2O$	0,250		
$CuSO_4. 5 H_2O$	0,025	*Růstové regulátory*	
$CoCl_{2.} 6 H_2O$	0,025	BAP	0,100
$FeSO_4 . 7 H_2O$	27,800	Kinetin	0,500
$Na_2 . EDTA . 2 H_2O$	37,300	pH	5,8 – 6,0

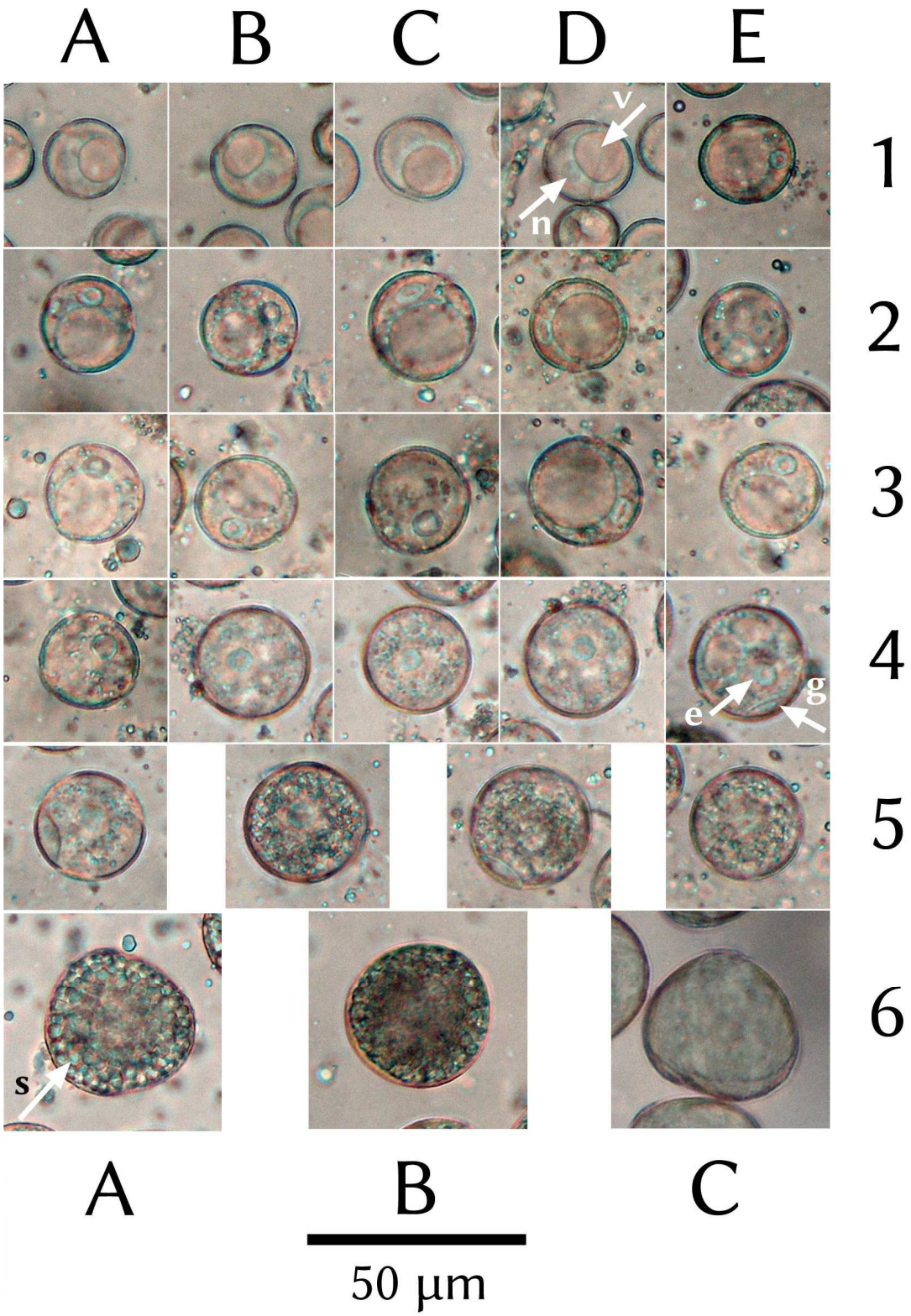
Tabulka 3. Složení kultivačního média C pro růst prýtů a tvorbu kořenového systému (upraveno dle Dieu a Dunwell 1988)

Anorganické komponenty	mg/l média	*Organické komponenty*	mg/l média
NH_4NO_3	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO_3	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
$CaCl_2 . 2 H_2O$	440,000	Thiamin	0,100
$MgSO_4. 7 H_2O$	370,000	Glycin	2,000
KH_2PO_4	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H_3BO_3	6,200	Sacharóza	10 g/l
$MnSO_4. 4H_2O$	22,300	Agar	8 g/l
$ZnSO_4. 7 H_2O$	8,600		
$Na_2MoO_4. 2 H_2O$	0,250		
$CuSO_4. 5 H_2O$	0,025		
$CoCl_{2.} 6 H_2O$	0,025	*(Růstové regulátory)*	
$FeSO_4 . 7 H_2O$	27,800	(IBA	4,000)
$Na_2 . EDTA . 2 H_2O$	37,300	pH	5,8 – 6,0

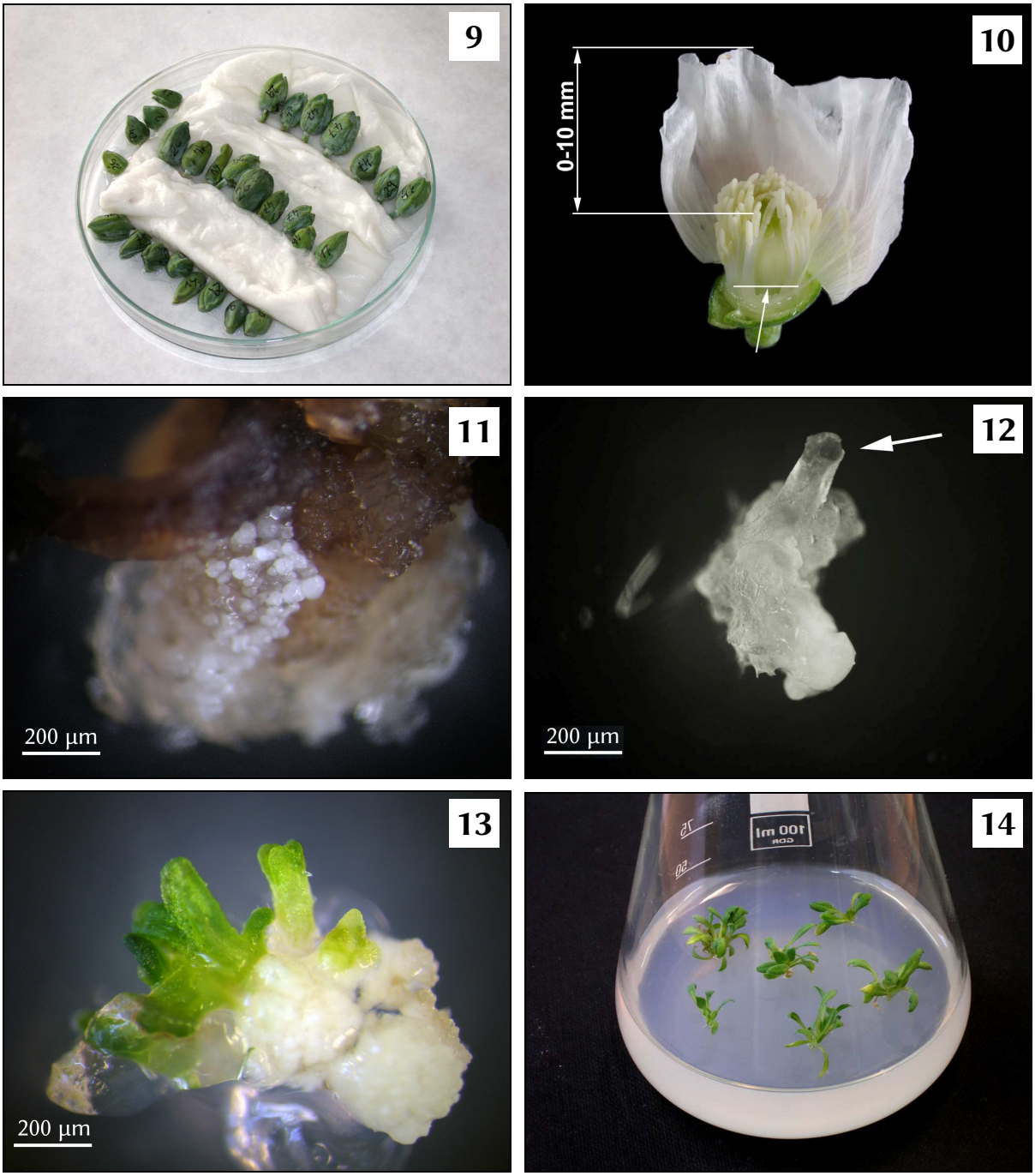
Obrázek 1. Výsev máku do hnízd do 80mm květníků
Obrázek 2. Prostřihávání na pět rostlin ve stádiu tří plně vyvinutých pravých listů
Obrázek 3. Prostřihávání na tři rostliny ve stádiu šesti plně vyvinutých pravých listů
Obrázek 4. Donorové rostliny ve 120mm květnících ve stádiu 12-14 pravých listů
Obrázek 5. Donorové rostliny v klimaboxu po přesázení do kontejnerů 190 × 190 mm
Obrázek 6. Donorové rostliny ozimých máků odebrané z polních podmínek.
Stádium 5–8 pravých listů, v 80mm květnících.



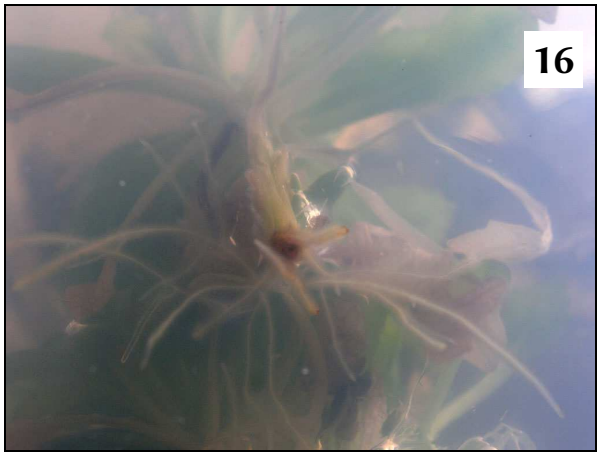
Obrázek 7. Vývojová stádia poupat máku s ohledem na vhodnost odběru.
A, F – délka květní stopky mezi bází poupěte a palistem kratší než 5 mm – mikrospory v nevhodném stádiu; B – D, G, H – poupě svírá se stopkou úhel 0 – 120° a stopka delší než 5 mm – optimální stádium pro odběr
Nejmenší dílek stupnice – 1 mm



Obrázek 8. Vývojová stádia mikrospor.
1A–D – středně jednojaderné – čirá cytoplasma, velká vakuola (v), jádro (n) méně patrné; 1E–4E – pozdně jednojaderné až časně dvojjaderné – mírně zrnitá cytoplasma, jádro dobře patrné ve formě prstence na periferii buňky; dokončené dělení jader na generativní (g) a vegetativní (e) je charakterizováno rozpadem vakuoly na několik menších (4B–4E) a jejich vstřebáním (5A); 5–6B – zrnitá cytoplasma – masivní syntéza škrobu (s) po rozdělení jader; 6C – zralé pylové zrno



Obrázek 9. Poupata různých délek a genotypů pro stanovení vývojového stádia mikrospor
Obrázek 10. Demonstrace nepřímé metody stanovení vývojového stádia mikrospor
Obrázek 11. Regenerace embryonálních struktur v prašníkové kultuře (médium A)
Obrázek 12. Regenerace prýtu v prašníkové kultuře (médium B)
Obrázek 13. Regenerace dobře vyvinutých prýtů na médiu B po přenesení na světlo
Obrázek 14. Prýty po odebrání z mateřského explantátu na médiu C
Průměr dna baňky 90 mm



Obrázek 15. Listové růžice před pasážováním na kořenící médium C s IBA
Obrázek 16. Počátek regenerace kořenového systému z řezných ploch na médiu C s IBA
Obrázek 17. Rostlina s dobře vyvinutým kořenovým systémem připravená k výsadbě do Perlitu
Obrázek 18. Rostliny v minerálním substrátu (Perlit) tři týdny po výsadbě
Průměr dna baňky 90 mm, průměr květníků 80 mm

Název: Klíma M. a kol. (2014): Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití

Autorský kolektiv: Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.
Ing. Vratislav Kučera, CSc.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
Praha 6 – Ruzyně
161 06

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena MZe ČR, osvědčením o certifikaci č. UKZUZ 097125/2014
Kontakt na autory: klima@vurv.cz

ISBN 978-80-7427-168-7