



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: 03.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://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

<b>I. Cíl metodiky.....</b>	<b>6</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky .....</b>	<b>6</b>
<b>II.1. Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>II.2. Metodika přípravy a udržování donorových rostlin.....</b>	<b>6</b>
<i>A) Pěstování v řízených podmínkách pro celoroční odběry explantátů .....</i>	<i>6</i>
<i>B) Pěstování ve skleníku ze sadby pro jarní odběry explantátů z ozimých odrůd.....</i>	<i>7</i>
<i>C) Pěstování ve skleníku pouze pro jarní a podzimní odběry explantátů.....</i>	<i>7</i>
<i>D) Pěstování v polních podmínkách pro časně letní odběry .....</i>	<i>7</i>
<b>II.3. Metodika zakládání prašnickových kultur .....</b>	<b>8</b>
<i>Odběr poupat .....</i>	<i>8</i>
<i>Povrchová sterilizace poupat a odstranění vnějších obalů .....</i>	<i>8</i>
<i>Stanovení vývojové fáze pylu.....</i>	<i>8</i>
<i>Založení prašnickové kultury.....</i>	<i>9</i>
<b>II.4. Metodika regenerace celistvých rostlin a výběr homozygotních materiálů... </b>	<b>9</b>
<i>Regenerace celistvých rostlin .....</i>	<i>9</i>
<i>Převod do nesterilních podmínek.....</i>	<i>9</i>
<i>Přemnožení rostlin a výběr dihaploidů pro využití ve šlechtění.....</i>	<i>10</i>
<b>III. Srovnání novosti postupů.....</b>	<b>11</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky .....</b>	<b>11</b>
<b>V. Ekonomické aspekty .....</b>	<b>12</b>
<b>VI. Seznam použité související literatury .....</b>	<b>13</b>
<b>VII. Seznam publikací, které předcházely metodice.....</b>	<b>14</b>
<b>VIII. Přílohy .....</b>	<b>15</b>
<i>Tabulka 1. Složení kultivačního média A pro regeneraci z explantátů .....</i>	<i>15</i>
<i>Tabulka 2. Složení kultivačního média B pro regeneraci prýtlů .....</i>	<i>15</i>
<i>Tabulka 3. Složení kultivačního média C pro růst prýtlů a tvorbu kořenového systému .....</i>	<i>16</i>
<i>Obrázek 1. Výsev máku do hnízd do 80mm květníků.....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 2. Prostřihávání na pět rostlin ve stádiu tří plně vyvinutých pravých listů .....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 3. Prostřihávání na tři rostliny ve stádiu šesti plně vyvinutých pravých listů .....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 4. Donorové rostliny ve 120mm květnících ve stádiu 12-14 pravých listů.....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 5. Donorové rostliny v klimaboxu po přesázení do kontejnerů 190 × 190 mm.....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 6. Donorové rostliny ozimých máků odebrané z polních podmínek. ....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázek 7. Vývojová stádia poupat máku s ohledem na vhodnost odběru. ....</i>	<i>18</i>
<i>Obrázek 8. Vývojová stádia mikrospor .....</i>	<i>19</i>
<i>Obrázek 9. Poupata různých délek a genotypů pro stanovení vývojového stádia mikrospor .....</i>	<i>20</i>
<i>Obrázek 10. Demonstrace nepřímé metody stanovení vývojového stádia mikrospor.....</i>	<i>20</i>
<i>Obrázek 11. Regenerace embryonálních struktur v prašnickové kultuře (médium A).....</i>	<i>20</i>

Obrázek 12. Regenerace prýtu v prašnickové kultuře (médiu 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 kořenicí 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 olejinou. 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* produkci 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 prašnickových 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<sub>1</sub> hybridů, od přípravy donorových rostlin, založení prašnickových 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  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  – 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 prostrhávání nůžkami na pět rostlin (obr. 2).
- ve fázi šesti plně vyvinutých pravých listů prostrhávání 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 přesazení
- přesazení 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  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  - 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 prostrhávání 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 časné letní odběry*

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



### II.3. Metodika zakládání prašниковých kultur

#### *Odběr pupat*

- odběr uzavřených pupat s částí stopky (cca 5 mm) před a na počátku háčkování (poupě a květní stopka svírají úhel 0–120°, délka stopky mezi bází pupěte 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 pupat 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 pupat v chladničce (5-8 °C) na navlhčené buničině (obr. 9); pupata spotřebovat v den odběru

#### *Povrchová sterilizace pupat a odstranění vnějších obalů*

- povrchová sterilizace pupat v laminárním boxu postříkem 70% etanolem (v/v), oschnutí pupěte na filtračním papíru (2-3 minuty)
- otevření pupěte pinzetami a odstranění kališních plátek; vyvarovat se dotyku vnějších částí kališních plátek a pinzet s okvětními plátky nebo prašniky; vyřadit pupata, do kterých vnikl roztok etanolu
- odříznutí okvětních plátek 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 mikroskop

#### *Stanovení vývojové fáze pylu*

Nezralá pylová zrna, mikrospory, jsou schopny procházet embryogenezi 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 pupěte a vývojovým stádiem mikroskop, stáří pylu je třeba u každého pupěte stanovovat individuálně až po odstranění kališních a korunních plátek ve sterilních podmínkách; při rutinních odběrech lze aplikovat dva způsoby:

#### *A) Nepřímo - dle délky okvětních plátek a semeníku*

- u pupat v optimálním vývojovém stádiu je rozdíl mezi délkou okvětních plátek a semeníkem (vč. blizny) přibližně 0-10 mm ve prospěch plátek (viz dvojitá šipka na obr. 10); prašniky by zároveň neměly svou délkou přesahovat okvětní plátky
- na bázi okvětních plátek pupat se staršími mikroskopami 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 pupat z celého rozsahu výše uvedeného rozmezí.

#### *B) Přímo – dle velikosti vakuoly v mikroskopách*

- příprava roztakových preparátů ve 13% roztoku (w/v) sacharózy z prašníků vyjmutých z pupat tří až čtyř stádií, dle rozdílu mezi délkou okvětních plátek a semeníku (viz způsob A)
- hodnocení vývojového stádia mikroskop pod mikroskopem při zvětšení 400× až 600×
- stanovení velikosti a lokalizace vakuoly v mikroskopách 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 prašnickové 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  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 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 ( $18 \pm 2$  °C, resp. 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )
- 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 přídatkem 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  $\pm 18$  °C, intenzita světla 80-100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 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 fertlních 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 prašnickových 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 prašnickových kultur, regenerace prýtlů 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 olejin 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 pronájemem 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 *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., Křištín 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 antimetabolic 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)

<i>Anorganické komponenty</i>	mg/l média	<i>Organické komponenty</i>	mg/l média
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO <sub>3</sub>	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440,000	Thiamin	0,100
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,000	Glycin	2,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	Sacharóza	30 g/l
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,300	Agar	8 g/l
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,600	<i>Růstové regulátory</i>	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,250	2,4-D	2,000
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	IAA	0,500
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	BAP	0,500
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,800	Kinetin	1,000
Na <sub>2</sub> . EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	37,300	pH	5,8 – 6,0

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

<i>Anorganické komponenty</i>	mg/l média	<i>Organické komponenty</i>	mg/l média
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO <sub>3</sub>	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	440,000	Thiamin	0,100
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,000	Glycin	2,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	Sacharóza	20 g/l
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,300	Agar	10 g/l
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,600		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,250	<i>Růstové regulátory</i>	
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,025	BAP	0,100
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025	Kinetin	0,500
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27,800	pH	5,8 – 6,0
Na <sub>2</sub> . EDTA . 2 H <sub>2</sub> O	37,300		



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

<i>Anorganické komponenty</i>	mg/l média	<i>Organické komponenty</i>	mg/l média
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000	Kys. nikotinová	0,500
KNO <sub>3</sub>	1900,000	Pyridoxin HCl	0,500
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440,000	Thiamin	0,100
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370,000	Glycin	2,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000	Myo-inositol	100,000
KI	0,830	Kasein (hydrolyzát)	1000,000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200	Sacharóza	10 g/l
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,300	Agar	8 g/l
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8,600		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,250		
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025		
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	<i>(Růstové regulátory)</i>	
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,800	(IBA	4,000)
Na <sub>2</sub> · EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	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

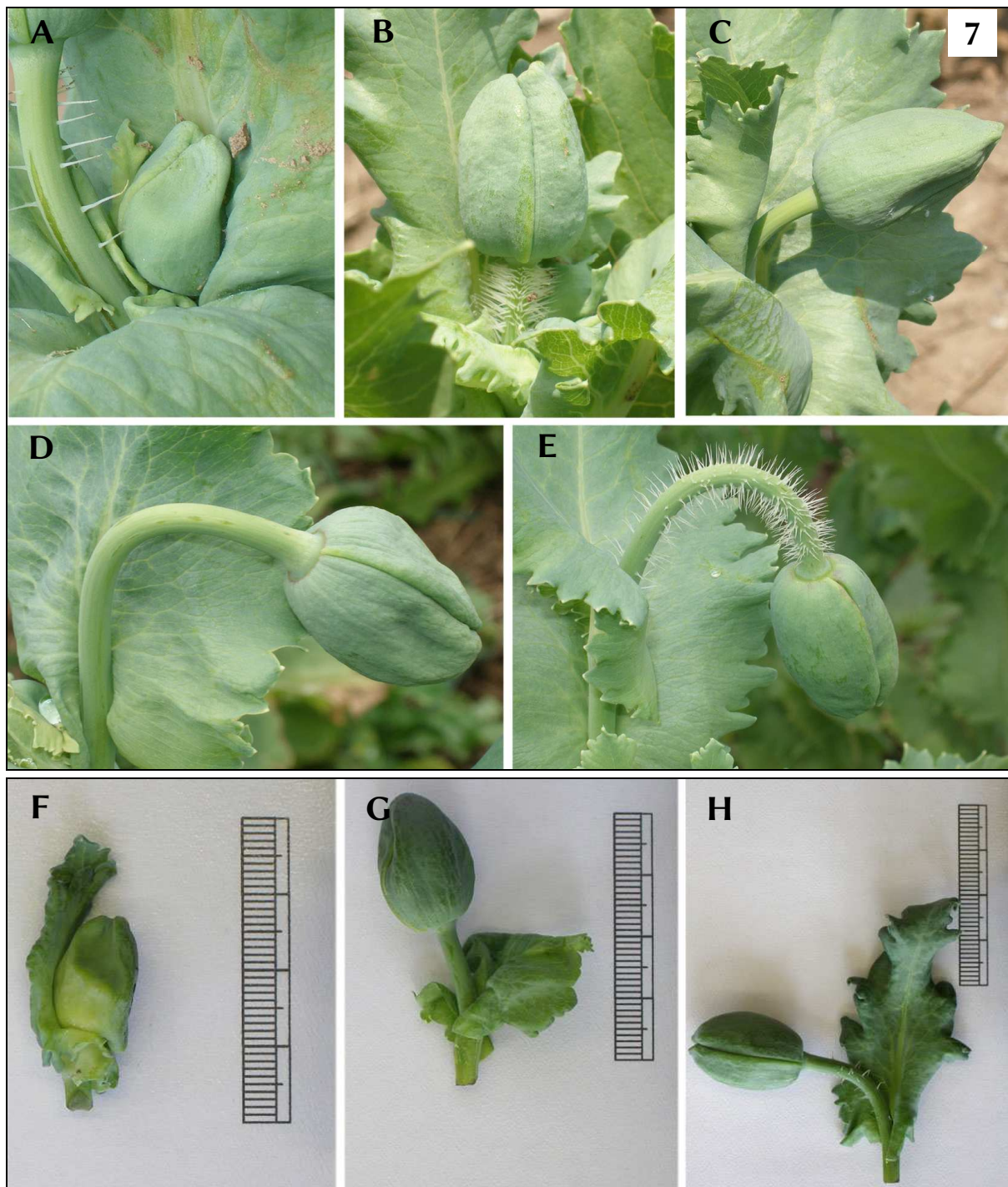
Obrázek 3. Prostřihávání na tři rostliny ve stádiu šesti plně vyvinutých pravých listů

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

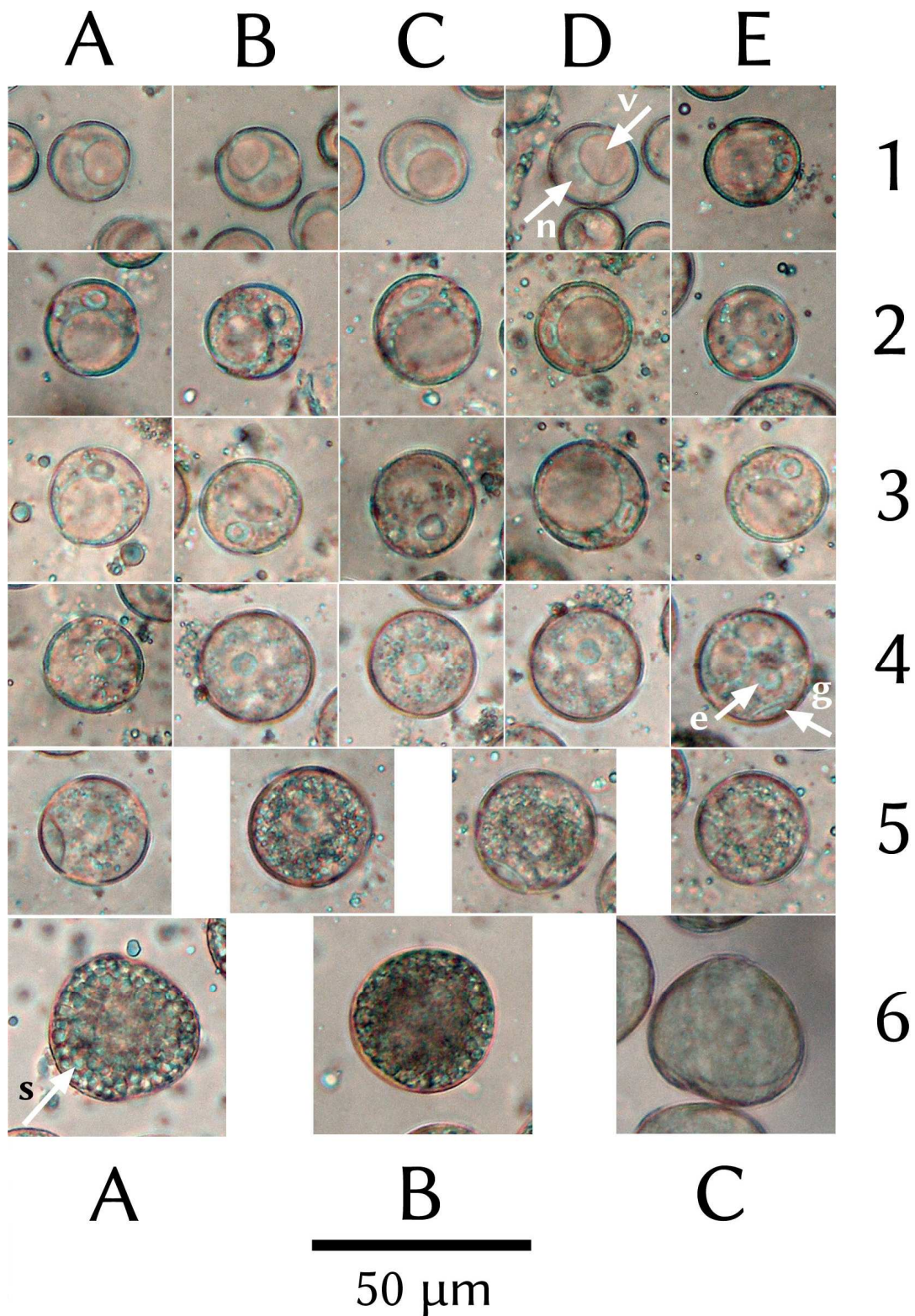
Obrázek 5. Donorové rostliny v klimaboxu po přesázení do kontejnerů 190 x 190 mm

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

Stádium 5-8 pravých listů, v 80mm květnících.

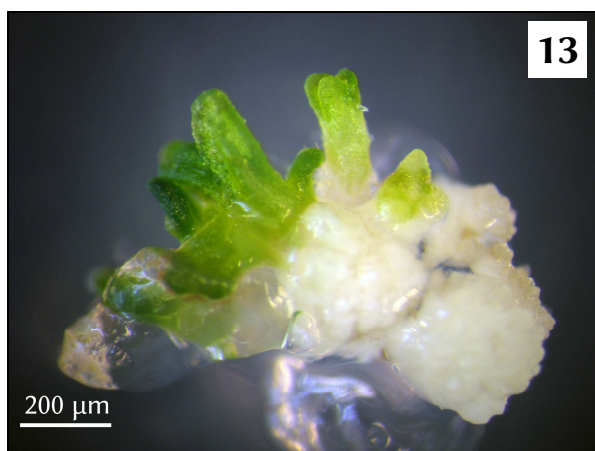
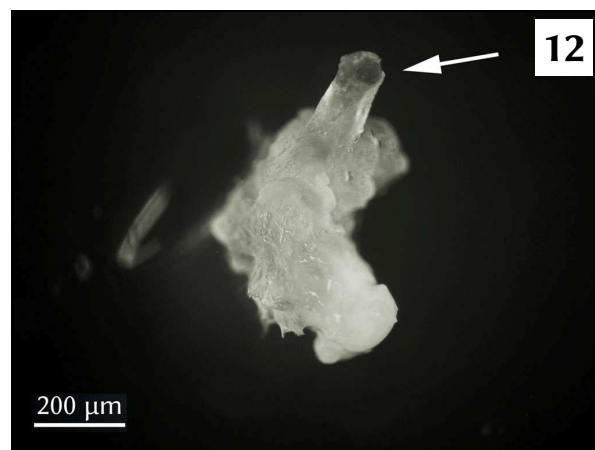
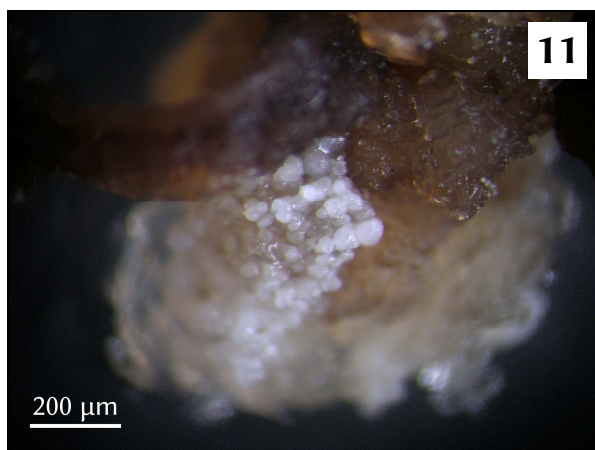


Obrázek 7. Vývojová stádia poupat máku s ohledem na vhodnost odběru.  
 A, F – délka květní stopky mezi bází poupěte a palistem kratší než 5 mm – mikrospory  
 v nevhodném stádiu; B – D, G, H – poupě svírá se stopkou úhel 0 – 120° a stopka delší  
 než 5 mm – optimální stádium pro odběr  
 Nejmenší dílek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



Obrázek 8. Vývojová stádia mikrospor.

1A–D – středně jednojaderné – čirá cytoplazma, velká vakuola (v), jádro (n) méně patrné;  
 1E–4E – pozdně jednojaderné až časně dvojjaderné – mírně zrnitá cytoplazma, 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 cytoplazma – 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 prašnickové kultuře (médium A)  
 Obrázek 12. Regenerace prýtu v prašnickové 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 kořenicí 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**