

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



**Fakulta tropického
zemědělství**

***In vitro* indukovaná polyploidie u *Solanum muricatum* Aiton**

Bakalářská práce

Praha 2022

Vypracoval:

Tadeáš Sochr

Vedoucí práce:

prof. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani

Prohlášení

estn prohlá-uji, že jsem tuto práci na téma *In vitro* indukovaná polyploidie u *Solanum muricatum* Aiton vypracoval samostatn , ve-který text je v práci p vodní a originální a v-echny použité literární prameny jsem podle pravidel Cita ní normy FTZ ádn uvedl v referencích.

V Praze dne í í í í

Tadeá-Sochr

Pod kování

Tímto bych chtěl podkovat svému vedoucímu práce prof. Dr. Ing. Eloyovi Fernándezi Cusimamanimu za poskytnuté rady a pomoc při zpracovávání práce. Také bych rád podkoval celému kolektivu laboratoře rostlinných explantátů za vysvětlení problematiky a pomoc při práci v laboratoři. Dále mé podkování patří české zemědělské univerzitě, hlavně pak Fakultě tropického zemědělství, za možnost pracovat v laboratoři rostlinných explantátů. Na závěr bych podkoval své rodině za podporu při studiu na české zemědělské univerzitě.

Abstrakt

In vitro indukovaná polyploidie u *Solanum muricatum* Aiton

Solanum muricatum Aiton je bylinný keč pocházející z jihoamerických And. Pěstuje se pro jedlé plody, které mají vysoký obsah vody, minerálů, kyseliny askorbové a nízký obsah kalorií. Plody se konzumují čerstvé nebo ve formě džusu, sirupu a džemu.

Cílem práce bylo získání autopolyploidních rostlin z diploidních rostlin ($2n=2x=24$) u druhu *S. muricatum* pomocí *in vitro* indukované polyploidizace.

Indukce polyploidie byla provedena u nodálních segmentů kultivovaných v *in vitro* podmínkách za použití oryzalinu (antimitotického činidla) v koncentracích 60 a 80 μM po dobu působení 24 a 48 hodin. Ovlivněné nodální segmenty byly kultivovány na MS médiu bez růstových regulátorů. Úroveň ploidie byla stanovena pomocí průtokové cytometrie.

Celkem bylo získáno 85 tetraploidních ($2n=4x=48$) a 19 mixoploidních rostlin. Účinnost polyploidizace byla 47,2 %. Získané tetraploidní rostliny vykazovaly odlišné morfologické znaky oproti původní diploidní rostlině. Tato metoda byla u *S. muricatum* použita poprvé.

Klíčová slova: Autopolyploidie, mikropropagace, nodální kultury, oryzalin, průtoková cytometrie

Author's abstract

***In vitro* induction of polyploidy in *Solanum muricatum* Aiton**

Solanum muricatum Aiton is an herbaceous shrub native to the South American Andes. It is grown for edible fruits that are high in water, minerals, ascorbic acid and low in calories. The fruits are eaten fresh or in the form of juices, syrups and jams.

The aim of the work was to obtain autopolyploid plants from diploid plants ($2n=2x=24$) in the species *S. muricatum* by *in vitro* induced polyploidization.

Polyploidy induction was performed on nodal segments cultured *in vitro* using oryzalin (antimitotic agent) at concentrations of 60 and 80 μM for 24 and 48 hours. The affected nodal segments were cultured on MS medium without growth regulators. The level of ploidy was determined by flow cytometry.

85 tetraploid ($2n=4x=48$) and 19 mixoploid plants were obtained. The polyploidization efficiency was 47.2 %. The obtained tetraploid plants showed different morphological features compared to the original diploid plant. This method was used for the first time in *S. muricatum*.

Key words: Autopolyploidy, flow cytometry, micropropagation, nodal cultures, oryzalin

Obsah

1. Úvod	- 1 -
2. Literární re-er-e.....	- 2 -
2.1 Morfologie	- 2 -
2.2 Taxonomie	- 3 -
2.3 P stování.....	- 4 -
2.4 Tř dci a choroby.....	- 5 -
2.5 Nutri ní složení.....	- 7 -
2.6 Použití.....	- 7 -
2.7 Těcht ní a kultivary.....	- 8 -
2.8 Mikropropagace	- 10 -
2.8.1 Mikropropagace <i>Solanum muricatum</i>	- 11 -
2.9 Polyploidizace.....	- 12 -
2.9.1 Antimitotická inidla	- 13 -
2.9.2 Metody detekce polyploidie	- 13 -
3. Cíle práce	- 15 -
4. Materiál a metodika.....	- 16 -
4.1 Rostlinný materiál	- 16 -
4.2 P íprava média	- 16 -
4.3 Množení rostlinného materiálu	- 17 -
4.4 Indukce polyploidie.....	- 18 -
4.5 Detekce polyploidie.....	- 18 -
4.6 Morfologické hodnocení	- 20 -
4.7 P evod do <i>ex vitro</i> podmínek	- 20 -
5. Výsledky a diskuze.....	- 21 -
5.1 Morfologické hodnocení	- 23 -
5.2 P evod do <i>ex vitro</i> podmínek	- 26 -
6. Záv ry	- 29 -
7. Reference.....	- 30 -

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Nutri ní slofení <i>Solanum muricatum</i>	Str. 7
Tabulka 2: Slofení MS média.....	Str. 17
Tabulka 3: Shrnutí výsledk poliploidizace u <i>Solanum muricatum</i> Aiton.....	Str. 21
Tabulka 4: Morfologické hodnocení tetraploidních rostlin a kontrolní rostliny po 2 m sících kultivace v <i>in vitro</i> podmínkách.....	Str. 24

Seznam obrázk :

Obrázek 1: Rostlina <i>Solanum muricatum</i> s plody.....	Str. 3
Obrázek 2: Adventivní ko eny <i>Solanum muricatum</i>	Str. 4
Obrázek 3: Kultivary <i>Solanum muricatum</i>	Str. 9
Obrázek 4: Schéma polyploidizace u <i>Solanum muricatum</i> Aiton.....	Str. 19
Obrázek 5: Histogram kontrolní (diploidní, $2n=2x=24$) rostliny.....	Str. 22
Obrázek 6: Histogram mixoploidní rostliny $60 \mu\text{M}/48\text{h}$	Str. 22
Obrázek 7: Histogram tetraploidní ($2n=4x=48$) rostliny $60 \mu\text{M}/48\text{h}$	Str. 23
Obrázek 8: Morfologické hodnocení nov získaných genotyp (P28, P31, P55, P56, P64 a P65 ó $2n=4x=48$) a kontrolní rostliny (K ó $2n=2x=24$) po 2 m sících kultivace v <i>in vitro</i> podmínkách.....	Str. 25
Obrázek 9: R st rostlin po 4 týdnech po p evodu do <i>ex vitro</i> podmínek.....	Str. 26
Obrázek 10: Morfologický rozdíl list diploidních (A: $2n=2x=24$) a tetraploidních rostlin (B-C: $2n=4x=48$).....	Str. 27

Seznam zkratek použitých v práci: zkontrolovat

KOH - hydroxid draselný

MS - Murashige & Skoog (1962) médium

NAA - kyselina 1-naftyloctová

BA, BAP - 6-benzylaminopurin

GA3 - kyselina gibberelová

IBA - kyselina 3-indolylmásečná

IAA - kyselina 3-indolylloctová

1. Úvod

Solanum muricatum Aiton, také známé pod –pan lským názvem pepino dulce, je bylinný ke pat ící do eledi Solanaceae. N kdy se pouffívá i doslovný eský p eklad –pan lského názvu šsladká okurkaõ. Pochází z jihoamerických And, kde se stále p stuje pro jeho jedlé, lehce sladké a – avnaté plody (Herraiz et al. 2016).

Je to vytrvalá rostlina, ale v t–inou se p stuje jako jednoletá. Rozmnořuje se pomocí stonkových říz , které lehce ko ení. Zralé ovoce se jí jako dezert a nezralé se pouffívá do salát (Rodríguez-Burruezo et al. 2002).

Komer n a experimentáln se p stuje v Austrálii, Chile, Kolumbii, Peru, Ekvádoru, Izraeli, Novém Zélandu, Turecku, USA a Tpan lsku (Contreras et al. 2016).

Solanum muricatum má vysoký obsah vody (92 %), nízký obsah kalorií a vysoký obsah minerál . Dále obsahuje vitamíny v etn thiaminu, niacinu, riboflavinu a kyseliny askorbové (vitamín C), které jsou prosp –né pro r zné metabolické a antioxida níh reakce (Di Scala et al. 2011). Ovoce obsahuje r zné slořky s antioxida ní aktivitou, které mají podle etných výzkumných studií pozitivní zdravotní ú inky na lidský organismus (Hsu et al. 2011; Sudhaa et al. 2011).

Indukovaná polyploidie je –lechtitelská metoda, p i které se znásobí po et chromozom v rostlin . Polyploidie m ře být vyvolána pomocí chemických a fyzických metod. V poslední dob se nejvíce pouffívá chemická metoda pomocí antimitotických inidel jako je oryzalin, kolchicin a trifluralin. Polyploidní rostliny mají asto vy–í výnos biomasy a lep–í toleranci k abiotickým stres m, neř rostliny diploidní (Rauf et al. 2021).

U *Solanum muricatum* se p edpokládá, ře by se mohly indukovanou polyploidí získat nové genotypy s vy–ím výnosem a lep–ími nutri ními vlastnostmi.

2. Literární re-er-e

2.1 Morfologie

Stonek: Zpo átku je stonek bylinný, ale postupem ásu zd evnatí. Vrcholové oblasti si zachovávají bylinnou konzistenci. Obvykle je zelený s více í mén í fialovými pigmentacemi. ez bývá kruhový, ale u n kterých kultivar je ty hranný nebo dokonce k ídlatý. Pokud je v kontaktu s vlhkým substrátem dokáfle vypou-t t adventivní ko eny z internodií (Torrent Silla 2014; Vásquez Figueroa 2021).

Listy: Jsou jednoduché protáhlé, kopinaté nebo slofené se 3 afl 7 lístky. Velikost list se pohybuje mezi 10 a 30 centimetry v závislosti na p dních a klimatických podmínkách. N které listy mohou dosáhnout afl 40 centimetr (Torrent Silla 2014).

Ko en: Je povrchový a velice rozv tvený. V podmínkách vysoké vlhkosti vytvá í hojně adventivní ko eny. M fle dosáhnout hloubky afl 60 cm, p í emfl 75 % ko en je v prvních 45 cm (Vásquez Figueroa 2021).

Kv ty: Jsou hermafroditní a mají p ti etnou oto enou korunu. Objevují se v hroznech slofených z 5 afl 20 kv t . V n kterých p ípadech jich m fle být více nefl 50 v jednom hroznu. Okv tní lístky jsou bílé s fialovými pruhy nebo jenom bílé. P í bezv t í a nedostatku opylova je nutné rostlinu podpo it mechanickým kmitáním kv t , aby do-lo k opylení (Riquero León 2014).

Plody: Odpovídají bobulí s centrální dutinou se semeny. N které kultivary produkují plody bez semen, jsou tedy partenokarpická. Tvar plod závisí zásadn na druhu kultivaru. V t-inou jde o plody vej ítého tvaru, ale existují i srd íté, protáhlé, válcovité a kulovité (Obrázek 1) (Constanza et al. 2019). V dob zralosti je podkladová barva flutá, sv tle flutá nebo zlatoflutá s p ek ífenými fialovými pruhy, které v závislosti na kultivaru a okolních podmínkách mohou pokrýt tém celý povrch plodu. U n kterých kultivar není flilkování fialové, ale zelené, nebo také fládné. Barva dufliny je r zná, od sv tle fluté po jasn oranflovou (Torrent Silla 2014). Plod obvykle váflí 100-400 g, ale záleflí hlavn í na kultivaru (Rodríguez-Burruezo et al. 2011).

Semena: Jsou velmi malá, flutohn dé afl sv tle hn dé barvy a ledvinovitého tvaru. Jeden gram m fle obsahovat 600 afl 900 semen (Constanza et al. 2019).



Obrázek 1: Rostlina *Solanum muricatum* s plody

Autor: Constanza et al. (2019)

2.2 Taxonomie

Solanum muricatum pat í do eledi Solanaceae, do rodu *Solanum*. Do tohoto rodu pat í dal-í druhy, jako jsou brambory, lilek a raj ata, ke kterým má blízký vztah. V rámci rodu *Solanum* pat í do podrodu *Potatoe*, do sekce *Basarthrum* a k ad *Muricata* (Anderson et al. 1996). V decký název *S. muricatum* byl dán v osmnáctém století Williamem Aitonem, z Královské botanické zahrady v Kew, v Londýn (Aiton et al. 1789).

V decký termín daný Aitonem š*muricatum*õ znamená s krátkými a tvrdými hrboly (Aiton et al. 1789), cofl nejspí-e ozna uje vzhled stonk p i p stování v podmínkách vysoké vlhkosti, kdy rostou ze stonk rostliny adventivní ko eny (Obrázek 2) (Herraiz García 2016).



Obrázek 2: Adventivní kořen *Solanum muricatum*

Autor: Herraiz García (2016)

Klasifikace *Solanum muricatum*

Řečnice	rostliny (Plantae)
Podřada	cévnaté rostliny (Tracheobionta)
Oddělení	krytosemenné rostliny (Magnoliophyta)
Třída	vyšší dvouděložné rostliny (Rosopsida)
Řád	lilkotvaré (Solanales)
Čeleď	lilkovité (Solanaceae)
Rod	<i>Solanum</i> L.
Druh	<i>Solanum muricatum</i> Aiton

2.3 Pěstování

Solanum muricatum je tropický druh z mírného, horského a přímořského podnebí. V andské oblasti se pěstuje v údolích a na západních svazích od hladiny moře až do 3000 m n. m. Průměrné teploty ve vysokých nadmořských výškách se pohybují okolo 18 °C a v nížinách kolem 24 °C, srážkami mezi 500 a 800 mm. Během podzimu a zimy teplota kolísá mezi 17-21 °C a vlhkost vzduchu se zvyšuje v důsledku mlhy a mrholení (Kumar et al. 2017).

Je možné je pěstovat i v Evropských klimatických podmínkách, ale musí být zajištěna ochrana před zimou. Rostlina může přežít nízkou teplotu až -2 °C, pokud není mráz dlouhý, i když může dojít k poškození listů a plodů. Díky svým velmi povrchným kořenům je náchylná k suchu, ale rychle se zotavuje (Fischer et al. 2021). Potřebuje více času na dozrání plodu než jiná široce známá zelenina z čeledi Solanaceae, jako jsou rajčata, paprika a lilek. Kvůli tomu se v Evropě často pěstuje ve sklenících, kde dorůstá až do výšky až 2 m a produkce plodů je 2-3 krát větší než u pěstování ve venkovních podmínkách (Gurung et al. 2016).

I když *S. muricatum* plodí semena je často množeno řízkováním. To se také doporučuje pro pěstované domácí kultivary a další lechtitelské odrůdy, kde každý kultivar musí být vegetativně množen, aby se zachovaly jejich původní vlastnosti. Pěstovaná je to trvalá rostlina, pěstuje se jako jednoletá kvůli její citlivosti na mráz (Contreras et al. 2016). Rostlina je středně tolerantní k slanosti (Ruiz & Nuez 1997) a roste dobře v chudých půdních podmínkách. Je však citlivé na vysoké teploty při opylování a nasazování plodů (Burge 1989).

Plodiny se pěstují vegetativní řízků *S. muricatum*, které se připravují seříznutím původních zdravých větví rostlin na délku 30-35 cm. Ty se následně nechají 2-3 dny ve stínu, aby se podpořilo rychlé zakořenění. Sází se do předem připravených řádků vzdálených od sebe 80 cm. Vzdálenost mezi rostlinami v řádku je 50 cm. Po výsevu se rostliny pravidelně zavlažují a odplevelují (Hernández Bermejo & León 1992).

2.4 Přírodní škůdci a choroby

Solanum muricatum může napadnout různý hmyz a roztoči, kteří jsou běžnými škůdci v zahradnických plodinách. Rostlina je však velmi energická a rychle se zotavuje z těchto útoků (Ruiz Martinez & Viñals 1996).

Hlavní škůdci, kteří mohou způsobit hospodářského významu na *S. muricatum*, jsou uvedeni zde:

- Svíluška chmelová (*Tetranychus urticae*)
- Molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*)
- Molice bavlníková (*Bemisia tabaci*)
- Mšice (*Aphidoidea*)

- Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*)
- Vrtalka (*Liriomyza trifolii*)
- Roztočík široký (*Poliphagotarsonemus latus*)

Solanum muricatum nemá vícemén problémy s plísními. Byly však zaznamenány, zejména ve vlhkém a deštivém podnebí napadení černí střílavou (*Alternaria alternata*) a plísní bramborovou (*Phytophthora infestans*) (Mione & Anderson 1992).

S. muricatum je citlivé na nemoci způsobené viry jako v této skupině druhů z čeledi Solanaceae (Ruiz Martinez & Viñals 1996). Ty nejbližší jsou následující:

- Virus bronzovitosti rajčete nebo TSWV (Tomato spotted wilt virus). Hlavními příznaky tohoto viru jsou žluté skvrny. Vyvolává příznaky podobné těm, které se objevují u rajčat (bronzové skvrny na listech, kroučky, nekróza výhonků). Nicméně u *S. muricatum* nejeví tento virus zjevné ztráty produkce, zatímco u rajčat ano.
- Virus mozaiky rajčete nebo ToMV (Tomato mosaic virus). Jde o mechanicky přenosný virus. Způsobuje vážné problémy při pěstování rajčat ve skleníku. Mezi příznaky patří světle zelená mozaika především v mladých listech, svrtnutí a deformace listů, krátká internodia, deformace plodů, pozdní dozrávání a snížení výnosu. U *S. muricatum* má v některých kultivarech způsobit vážné poškození rostliny (Prohens et al. 1998).
- Virus mozaiky pepina nebo PepMV (Pepino mosaic virus). Přenáší se také mechanicky a vytváří žlutou mozaiku na mladých listech *S. muricatum*, i když není známo, zda způsobuje určitou ekonomickou ztrátu při jeho pěstování (Jones et al. 1980).

2.5 Nutri ní slofení

Solanum muricatum je ovoce s vysokým obsahem vody (>92 %) a zejména nízkým obsahem kalorií (250 kcal/kg). Má vysoký obsah draslíku (> 1 g/kg) a vitamínu C (>200 mg/kg) (Campos et al. 2018). Další obsahy nutri níh látek v *S. muricatum* jsou uvedeny v Tabulce 1. Sudhaa et al. (2011) zjistili, že ethylový extrakt z plodu pepina obsahuje zna né množství fenolických látek a flavonoidů a právě rozsah fenolických látek přítomných v tomto extraktu je zodpovědný za jeho výraznou antioxida ní aktivitu.

Tabulka 1: Nutri ní slofení *Solanum muricatum*

Slou enina	Hodnoty na 100g
Voda (%)	90-92
Suchá hmotnost (g)	6,8-8,2
Bílkoviny (g)	0,10-0,13
Lipidy (mg)	24,6-44,4
Rozpustné cukry (g)	4,9-6,4
Škrob (mg)	20,0-90,0
Celulóza (mg)	154-220
Hemicelulóza (mg)	40,1-53,6
Pektin (mg)	26,7-34,5
Vitamín C (mg)	46,0-68,8
Draslík (mg)	115-123
Vápník (mg)	2,3-3,0
Ho ťík (mg)	5,3-6,1
Sodík (mg)	0,76-2,30

Zdroj: Redgwell & Turner (1986)

2.6 Poufití

Zralé plody *Solanum muricatum* lze konzumovat jako sou ást salátů a osvěžujících jídel. Je možné je konzumovat i v džusech, sirupech, džemu nebo zmrzlinách. V některých oblastech, když je ovoce velmi nezralé, může být konzumováno vařené (Torrent Silla 2014).

Na základ studie Hsu et al. (2011) by mohlo *S. muricatum* sloužit jako funk ní potravina pro prevenci nebo zmír ní diabetu. Bylo zji-t no, že vodný extrakt z plodu *S. muricatum* vykazoval antioxida ní, protizán tlivou a antiglykativní ochranu u testovaných my-í. Tyto úinky mohou být zap í in ny tím, že *S. muricatum* obsahuje velké množství kyseliny askorbové, fenolových kyselin a flavonoid .

Shathish & Guruvayoorappan (2014) provedli experiment na my-ích, p i kterém zjistili, že lé ba *S. muricatum* m že nejen stimulovat imunitní systém, ale také významn inhibovat r st nádor. Po lé b *S. muricatum* dále zaznamenaly prodloužení délky žívota zví at. Výsledky studie ukázaly, že extrakt z plod má silné imunomodula ní, protirakovinné a protizán tlivé úinky. Extrakt také inhiboval edém vyvolaný karagenanem a formaldehydem.

Ren & Tang (1999) p i hledání nádorových inhibitor z r zných druh rostlin zjistili, že extrakty ze *S. muricatum* mohou inhibovat r st nádor *in vivo* i *in vitro* indukci apoptózy. Studie ukazuje, že extrakt z *S. muricatum* m že p edstavovat slibnou novou chemickou entitu, která cílí na r zné nádorové bu ky spou-t ním apoptózy.

V dal-í studii bylo zji-t no, že by se vodný extrakt z list *S. muricatum* mohl v budoucnu pouít jako funk ní potravina proti alkoholovému ztu n ní jater. Toto pouítí zjistili Hsu et al. (2018), kte í vodný extrakt z list *S. muricatum* testovali na my-ích s vyvolaným alkoholovým po-kozením jater. Z výsledk odhalily d kaz, že listy *S. muricatum* mají hepatoprotektivní úinky a schopnost inhibovat progresi alkoholového ztu n ní jater. Dále zjistili, že by extrakt z list *S. muricatum* mohl chránit játra proti oxidativnímu po-kození vyvolanému etanolem a proti akumulaci lipid .

2.7 TMlechtní a kultivary

Podle literárních studií má *Solanum muricatum* diploidní počet chromozom $2n=2x=24$ (Daunay et al. 1995; Contreras et al. 2016; Song et al. 2022).

U *S. muricatum* bylo zaznamenáno mnoho lechtitelských program pro zlep-ení organoleptických vlastností a adaptace na agroklimatické podmínky. D vody pro tato lechtní byly vysoká citlivost ovoce na podmínky prostředí, zejména vysoké teploty, které ovliv ují pylovou žívtoschopnost; -patná kvalita ovoce a dlouhá

doba potřebná pro zrání ovoce (Prohens et al. 1996). Různé strategie, jako je používání různých zdrojů genetických zdrojů, vyvolávání interakce genotypu s prostředím, používání klonálních hybridů a zavádění genů z divokých druhů, napomohly významnému pokroku v komerčním potenciálu *S. muricatum* a umožnily vývoj nových kultivarů a selekčních materiálů pro izopozemních nových agroklimatických podmínkách. Velké množství kultivarů *S. muricatum* je zobrazeno na Obrázku 3.



Obrázek 3: Kultivary *Solanum muricatum*

Autor: Rodríguez-Burruezo et al. (2011)

Kultivary pěstované na Novém Zélandu

Na Nový Zéland byly zavedeny z oblasti And nebo byly získány přímo na Novém Zélandu výběrem ze semen (Ruiz Martinez & Viñals 1996).

Nejdůležitější jsou:

- **Asca:** velmi produktivní. Velké, vejčité, fluté plody se zelenými pruhy a středně nízkým obsahem rozpustných pevných látek.
- **Kawi:** střední produkce. Středně velké plody, podlouhlé, světle zelené s fialovými pruhy a středním obsahem rozpustných pevných látek.
- **El Camino:** nejpestovanější a s dobrou produkcí. Plody středně velké, vejčitého tvaru, fluté s fialovými pruhy a vysokým obsahem rozpustných pevných látek.

Kultivary pěstované ve Španělsku

Ve Španělsku po několikaletémlechtitelském programu selekce a zlepšování, ze semen z centra pěstovaného *S. muricatum*, vznikla řada nových kultivarů. Všechny byly vyvinuty na Polytechnické univerzitě ve Valencii a byly přizpůsobeny středomořskému klimatu.

Nejvíce důležitější jsou:

- **Sweet Long** (Ruiz et al. 1997): střední produkce. Podlouhlý plod, zlatoflutý s fialovou filinatinou a vysokým obsahem rozpustných pevných látek.
- **Sweet Round** (Ruiz et al. 1997): střední produkce. Kulatý, zlatoflutý plod s fialovou filinatinou a vysokým obsahem rozpustných pevných látek.
- **Puzol** (Prohens et al. 2002): vysoká produkce. Velké, podlouhlé plody, zlatofluté, bohaté fialové filinkování a střední obsah rozpustných pevných látek.
- **Turia** (Rodríguez-Burruezo et al. 2003): vysoká produkce. Plody střední velikosti, oválné, zlaté barvy s výraznými fialovými filinkami a středním obsahem rozpustných pevných látek.
- **Valencia** (Rodríguez-Burruezo et al. 2004): střední vysoká produkce. Středně velké, podlouhlé, zlatavě zbarvené plody s úzkými fialovými filinkami a velmi vysokým obsahem rozpustných pevných látek.

Existují další méně známé kultivary, které byly vylechtěny v Austrálii, USA a Izraeli. Jako je například: Colossal, Temptation, Cascade Gold, Miski Prolific, Pepo a Becky (Contreras et al. 2016).

2.8 Mikropropagace

Mikropropagace je metoda rychlého množení identických rostlin za použití *in vitro* technik (Kubota 2001). V současnosti je to komerčně nejúspěšnější biotechnologie, která vede k rychlému vytvoření velkého množství klonálních rostlin, které jsou za mnoha okolností prostě virů a patogenů (Lobert & Altman 2010).

V této fázi zahrnuje 4 fáze:

Fáze I: Zakládání kultur

Cílem této fáze je zavést vybrané explantáty do kultury při minimalizaci kontaminace a vytvoření příznivého prostředí pro tvorbu výhonků. Nejčastěji používanými explantáty jsou listy, adventní meristémy a axilární pupeny. Vybraný explantát je před použitím povrchově sterilizován a omyt (Iliev et al. 2010).

Fáze II: Multiplikace

Tato fáze zahrnuje především množení výhonků z explantátu. Tyto výhonky se přesazují do nového kultivačního média s přidáním fytohormonů, nejčastěji cytokininů (Murashige 1977).

Fáze III: Zakoeování

Fáze zakoeování připravuje regenerované rostliny k transplantaci z podmínek *in vitro* do podmínek *ex vitro* v místnostech s kontrolovaným prostředím. Tato fáze může zahrnovat nejen zakoeování výhonků, ale také úpravu rostlin, aby se zvýšil jejich potenciál pro aklimatizaci a přežití během přesazování. Toho se docílí přidáním rostlinných hormonů do média (Pierik 1987).

Fáze IV: Aklimatizace

V této fázi jsou rostliny z *in vitro* prostředí přeneseny do pěstí. Aby rostliny přežily, jsou převezeny nejprve do skleníku, kde se aklimatizují. Rostliny jsou ve skleníku udržovány po dobu 2-3 týdnů ve vysoké vlhkosti. Při tom jsou vystavovány vyššímu světelnému záření. Díky tomu prochází postupnou změnou anatomie a morfologie listů a jejich průduchy začínají fungovat (Jha & Ghosh 2005).

2.8.1 Mikropropagace *Solanum muricatum*

I když *S. muricatum* není tak známá plodina, existuje řada studií o jeho mikropropagaci. Již roku 1988 provedl Pauli úspěšnou mikropropagaci *S. muricatum*, kdy se ho snažil kultivovat na dvou médiích A a B. Úspěšnější výsledky zaznamenal na médiu B, které obsahovalo vedle základních složek MS média ještě 0,01 mg/l NAA, 0,1 mg/l GA3, 250 mg/l inositolu, 2,5 mg/l thiaminu HCl a 0,5 mg/l BA. Toto médium mělo vyšší rychlost množení (4,2) než médium A (3,2). Po propagaci kultivoval rostliny na polovičním MS médiu s 1 mg/l IBA, ve kterém všechny rostliny zakoeovaly (Pauli 1998).

Cílem studie Cavusoglu a Sulusoglu (2013) bylo vytvořit efektivní a spolehlivý protokol pro *in vitro* mikropropagaci *S. muricatum*. Zjistili, že nejlepší médium pro indukci výhonků bylo MS médium s 1 mg/l BAP a 2 mg/l NAA. Nejlepší médium pro kvalitní tvorbu kořenů s nízkým vznikem kalusů bylo médium MS s dávkou 0,5 mg/l IBA.

Faizy et al. (2021) vytvořili protokol na mikropropagaci *S. muricatum* z nodálních segmentů. Nejlepší množení výhonků zaznamenali na médiu MS s dávkou 3 mg/l kinetinu. Nejlepší tvorby kořenů dosáhli při použití 0,2 mg/l IAA v MS médiu. Nejdelší délku kořene zaznamenali při použití 0,3 mg/l IAA v MS médiu.

2.9 Polyploidizace

Polyploidie je více než dvojnásobné zvýšení základního, tj. haploidního počtu chromozomů. Původně se vyskytující polyploidní rostliny lze identifikovat v široké škále taxonů a nedávné odhady naznačují, že téměř všechny existující krytosemenné rostliny si prošly ve své evoluční historii polyploidizací. Umění indukce polyploidie může poskytnout cenný nástroj, který pomůže pochopit evoluční procesy a usnadní výběr nových rostlin (Touchell et al. 2020).

Polyploidie v somatických buňkách může být indukována narušením chromozomové disjunkce v anafázi mitózy. K tomu účelu se používá několik stresových faktorů, jako je teplotní šok, poranění rostlin nebo rentgenové záření. Nejlepší výsledky se dosahuje aplikací velmi vysokých nebo velmi nízkých teplot v pozdější fázi embryogeneze, během prvních dělení zygoty. Nejčastěji používanou metodou znásobení počtu chromozomů v somatických buňkách kulturních rostlin je mitotická polyploidizace pomocí antimitotických inhibitorů (Trojak-Goluch et al. 2021).

Nejrozsáhlejší důsledkem polyploidie u rostlin je nárůst velikosti buněk, způsobený větší počtem genových kopií. V důsledku toho mohou mít polyploidní rostliny větší orgány, jako například kořeny, listy, hlízy, plody, květy a semena, než diploidní formy. Zvýšení velikosti buněk nemusí vždy vést ke zvětšení velikosti celé rostliny nebo jejích orgánů, jelikož počet buněk dělení u polyploidie je často snížen. Polyploidní rostliny mají také nižší rychlost růstu a mají tendenci kvést později nebo déle než diploidní (Sattler et al. 2016).

2.9.1 Antimitotická inidla

Antimitotická inidla jsou látky, které se váží na tubulinové dimery a tím inhibují mitózu. Mezi tyto inidla patří: kolchicin, oryzalin (3,5-dinitro-N₄,N₄-dipropylsulfanilamid), trifluralin 2,6-dinitro-N,N-dipropyl-4-(trifluoromethyl)anilin. Nejvíce používané na indukci polyploidie jsou oryzalin a kolchicin (Talebi et al. 2017).

Kolchicin je přirozeně se vyskytující alkaloid, který se získává z celých rostlin *Colchicum autumnale* L. (ocún jesenní). Má nízkou afinitu k rostlinným tubulinům, a proto se musí používat ve vyšších milimolárních hladinách, aby se dosáhlo účinné indukce polyploidie v rostlinách. Na rozdíl od toho má vysokou afinitu k živočišným tubulinům, čímž se vysvětluje jeho vysoká toxicita pro člověka už při nízkých koncentracích (Eng & Ho 2019).

Oryzalin je dinitroanilinový herbicid s poměrně nízkou toxicitou pro zvířata a houby. Na rozdíl od kolchicinu, který interaguje s β -tubulinem, se oryzalin váže na α -tubulin. A oproti němu má vyšší afinitu k rostlinným tubulinům (Langhans et al. 2009).

Trifluralin je herbicid patřící do stejné skupiny jako oryzalin. Působí hlavně na meristémy a tkáně podzemních orgánů. Má na rozdíl od kolchicinu, vyšší afinitu k rostlinnému tubulinu než k živočišnému tubulinu (Zhao & Simmonds 1995).

2.9.2 Metody detekce polyploidie

Existuje řada metod jak detekovat úroveň polyploidie. Mezi tyto metody patří například: průtoková cytometrie, počítání chromozomů, morfologické a anatomické hodnocení.

Průtoková cytometrie je technologie, která poskytuje rychlou multiparametrickou analýzu jednotlivých buněk ve stanovovaném vzorku. Průtokové cytometry využívají lasery jako zdroje světla k produkci signálů rozptýleného světla a fluorescenčního světla, které jsou detektory, jako jsou fotodiody nebo fotonásobiče. Tyto světelné signály jsou převedeny na elektronické signály, které jsou analyzovány počítačem a zapsány do datového souboru ve standardizovaném formátu. Populace buněk mohou být analyzovány anebo purifikovány na základě jejich fluorescenčních charakteristik nebo charakteristik rozptylu světla (McKinnon 2018).

Výsledkem analyzovaných vzorků jsou histogramy ukazující obsah DNA. Průtoková cytometrie je rychlá, spolehlivá a jednoduchá metoda která umožňuje analýzu velkého množství cílových rostlin v krátkém časovém období (Roy et al. 2001; Doležel et al. 2007).

Další metodou identifikace je počítání chromozomů. Touto metodou se získá přesný počet chromozomů v buňce. Nejčastěji se k počítání chromozomů používají buňky kořenových epitelů z mladých semenáčků. Počet chromozomů se stanovuje během mitotického buněčného dělení. Tato technika je ve srovnání s průtokovou cytometrií jednodušší a přesnější. Ale je velmi pracná, časově náročná a vyžaduje aktivní sledování buňky (Ochatt et al. 2011).

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo získání autopolyloidních rostlin z diploidních rostlin ($2n=2x=24$) u druhu *Solanum muricatum* Aiton pomocí *in vitro* indukované polyploidizace.

Cíl práce byl stanoven dle následujících hypotéz:

- I. Oryzalin je optimálním antimitotickým inidlem pro indukci somatické polyploidie u *Solanum muricatum* Aiton.
- II. Polyploidizace je úinná metoda k získání nových genotyp *Solanum muricatum* Aiton s odli–nými morfologickými znaky.

4. Materiál a metodika

Veškerý výzkum byl prováděn v Laboratorii rostlinných explantátů na Katedře tropických plodin a agrolesnictví na Fakultě tropického zemědělství na České zemědělské univerzitě v Praze.

4.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál *Solanum muricatum* Aiton byl zakoupen v obchodě se semeny. Semena byla před zasetím v aseptických podmínkách (*in vitro*) namořena do 70% etanolu po dobu 20 vteřin. Následně byla převedena do 1% roztoku chlornanu sodného (NaClO) s kapkou smědla (Tween 20). V tomto roztoku byla 15 minut tepána na teplotě při 115 otáčkách za minutu. Poté byl roztok přenesen do laminárního boxu, kde byla semena promyta ve třech destilovaných vodách. Semena pak byla po jednom, pomocí sterilní pinzety, vložena do předem připravených zkumavek s MS médiem. Zkumavky byly poté umístěny do kultivační místnosti s podmínkami 25 °C přes den, 20 °C v noci a s intenzitou světla 3500 lx ve fotoperiodách 16 h/den a 8 h/noc. Po třech týdnech začala semena klíčit.

4.2 Příprava média

K výzkumu bylo použito pouze médium Murashige a Skoog (1962) bez přidání rostlinných hormonů. Původní složení MS média je v Tabulce 2. Doba byly přidány všechny složky podle Tabulky 2. Do roztoku bylo poté přidáno 30 g sacharózy a 100 mg myo-inositolu. Vše bylo dohromady smícháno a změněno pH metrem. Na úpravu pH na 5,7 byl použit 1M KOH. Po změně pH bylo do roztoku přidáno 8 g agaru a vše bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1 l. Za stálého míchání bylo médium rozlито do zkumavek o velikosti 15 x 2,5 cm a na závěr bylo vloženo do autoklávy, kde bylo sterilizováno při teplotě 120 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 2: Slofení MS média

Zásobní roztok na 1 litr destilované vody		Naválka na 1 litr zásobního roztoku	Objem na 1 litr média pH 5,7
A	NH ₄ NO ₃	16,5 g	100 ml
	KNO ₃	19 g	
	CaCl ₂	3,3 g	
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,7 g	
	KH ₂ PO ₄	1,7 g	
B	H ₃ BO ₃	620 mg	10 ml
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	2,23 g	
	ZnSO ₄ x 4H ₂ O	860 mg	
C	KI	83 mg	10 ml
	NaMoO ₄ x 4H ₂ O	25 mg	
D	CuSO ₄ x 5H ₂ O	2,5 mg	10 ml
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,5 mg	
E	Na ₂ EDTA	3,72 mg	10 ml
	FeSO ₄	2,78 mg	
V	Kyselina nikotinová	50 mg	10 ml
	Pyridoxin (B6)	50 mg	
	Thyamin (B1)	10 mg	
	Glycin	200 mg	

Zdroj: Murashige & Skoog (1962)

4.3 Množení rostlinného materiálu

Aby se zamezilo kontaminaci, byl rostlinný materiál množen v laminárním boxu, který byl vysterilizován nejmén 40 minut UV lampou. Po sterilizaci boxu byl nechán zapnut ventilátor. Poufité nástroje jako je skalpel, pinzeta a Petriho misky byly p edem zabaleny do alobalu a byly sterilizované p i teplot 160 °C 3 hodiny v horkovzdu-ném sterilizátoru. V-echny nástroje a zkumavky, nefl byly vlofeny do laminárního boxu, byly post íkány 70% etanolem. P ed propagací rostlin byly skalpel a pinzeta namo eny v 90% etanolu a následn zapáleny kahanem. K množení byla poufita nejlépe rostoucí rostlina. Rostlina byla vytafena ze zkumavky a byla

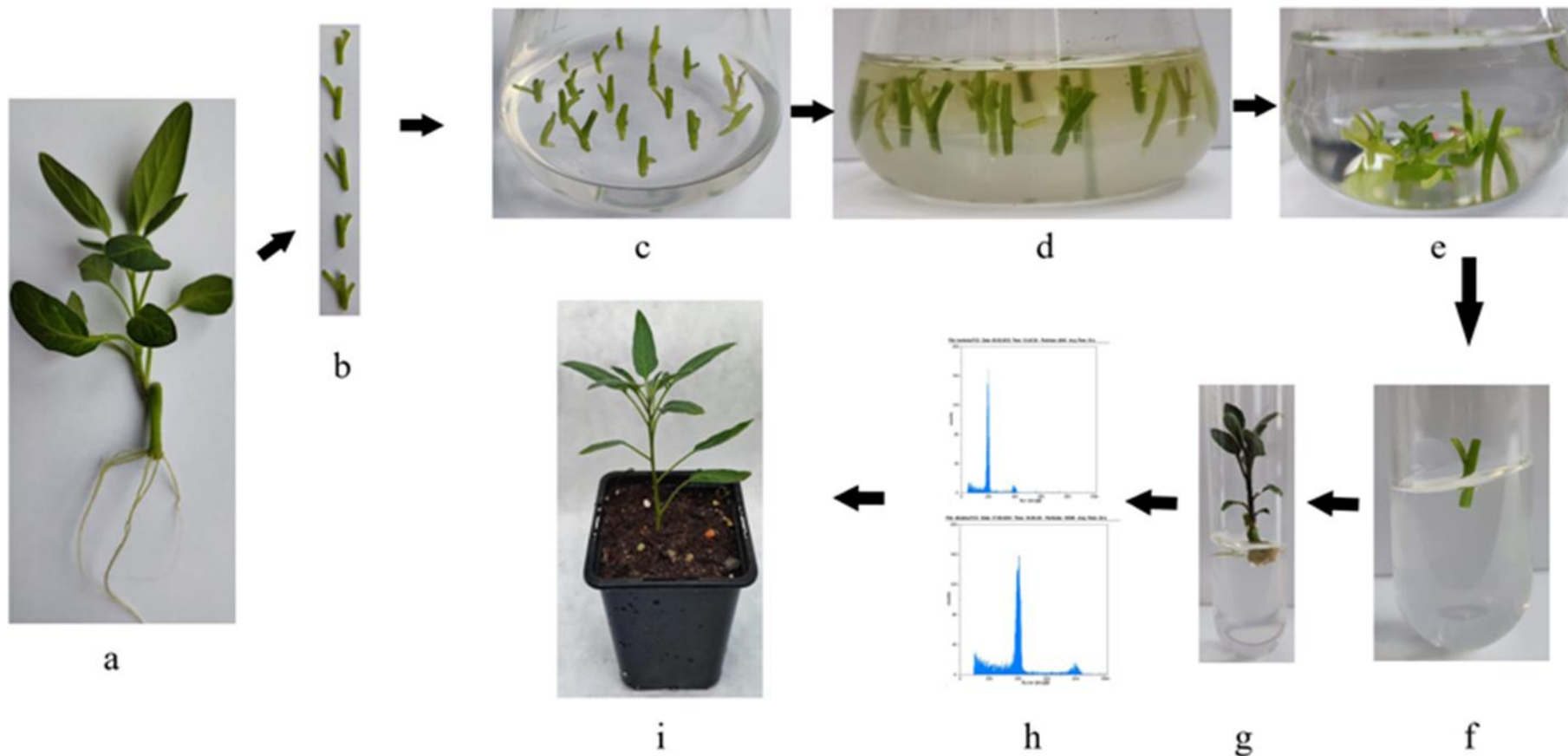
zbavena skalpelem všech listů. Poté byla narezána na nodální segmenty podle Obrázku 4 a vložena do nových zkumavek s médiem. Před pokusem polyploidizace bylo zapotřebí namnožit dostatečné množství rostlinného materiálu pomocí nodálních kultur.

4.4 Indukce polyploidie

Pro pokus bylo namnoženo 180 podobně stejně velikých 1 cm nodálních segmentů. Ty byly poté vloženy po 45 do těchto kádinek s médiem. Kádinky pak byly přikryty alobalem a vloženy na 2 dny do kultivační místnosti, aby se rostliny aklimatizovaly. Celý experiment byl prováděn v laminárním boxu se sterilním náčiním. Ze zásobního 10 mM oryzalinu bylo připraveno 200 ml roztoku o koncentraci 60 μ M a 200 ml roztoku o koncentraci 80 μ M. Takto připravený oryzalin byl nalit do kádinek s nody, kde byl nechán působen 24 a 48 hodin u každé koncentrace. Po 24 a 48 hodinách byl oryzalin slit a nodální segmenty byly vyndány z média. Následně byly promyty ve těchto sterilních destilovaných vodách, lehce se ožnuty na Petriho misce a zasazeny po jednom do zkumavek s MS médiem. Celé schéma polyploidizace je uvedeno na Obrázku 4.

4.5 Detekce polyploidie

Detekce polyploidie byla provedena v prtokovém cytometru 2 měsíce po indukci polyploidie. K detekci byly použity listy ovlivněných rostlin a list kontrolní rostliny. Na malé Petriho misce byl pomocí špičky rozkrájen na malé částky list s 1 ml roztoku Otto I (0.1 M kyselina citrónová, 0.5% Tween 20). Vše bylo poté pomocí pipety přefiltrováno přes nylonový filtr do malé zkumavky. K tomuto roztoku bylo přidáno 1 ml Otto II (0.4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) + fluorescenční barvivo DAPI (4',6-diamidin-2-fenylyndol). Vzorek ve zkumavce byl pak měřen v Partec PAS prtokovém cytometru.



Obrázek 4: Schéma polyploidizace u *Solanum muricatum* Aiton: **a)** Rostlina kultivována v *in vitro* podmínkách; **b)** Nodální segmenty; **c)** Kultivace nodálních segmentů po dobu 2 dnů; **d)** Indukce polyploidie u nodálních segmentů pomocí antimitotického inidla (oryzalinu) v koncentracích 60 μM a 80 μM po dobu 24 h a 48 h; **e)** Promývání nodálních segmentů sterilní destilovanou vodou; **f)** Kultivace jednotlivých ovlivněných nodálních segmentů na MS médiu (Murashige & Skoog 1962); **g)** Regenerace a kultivace ovlivněných rostlin; **h)** Určení úrovně ploidy u ovlivňovaných rostlin pomocí proukové cytometrie; **i)** Pěstování a pěstování nových získaných genotypů autotetraploidních rostlin v *ex vitro* podmínkách.

4.6 Morfologické hodnocení

K morfologickému hodnocení bylo vybráno 6 nově získaných genotypů (P28, P31, P55, P56, P64, P65) a kontrolní rostlina, které byly sledovány po dobu 2 měsíců. Ve kterém pozorování bylo provedeno v *in vitro* podmínkách. Po skončení sledování byly hodnoceny tyto údaje: délka stonku, délka nejdelšího kořene, počet kořenů, počet listů, délka listu a délka listu. Výsledky měření byly vyhodnoceny v softwaru STATISTICA 12 dle Kruskal-Wallisova testu na hladině významnosti 0,05.

4.7 Převod do *ex vitro* podmínek

Vybrané rostliny s dobře vyvinutým kořenovým systémem byly vyjmuty ze zkumavek a omyty vlažnou vodou od zbylého média. Rostliny byly zasazeny do květináčů se sterilním zahradnickým substrátem. Pro zajištění dostatečné vlhkosti nezbytné pro přežití rostlin po převodu do *ex vitro* podmínek, byly po dobu 1 týdne přikryty igelitem. Rostliny byly poté pěstovány ve skleníku.

5. Výsledky a diskuze

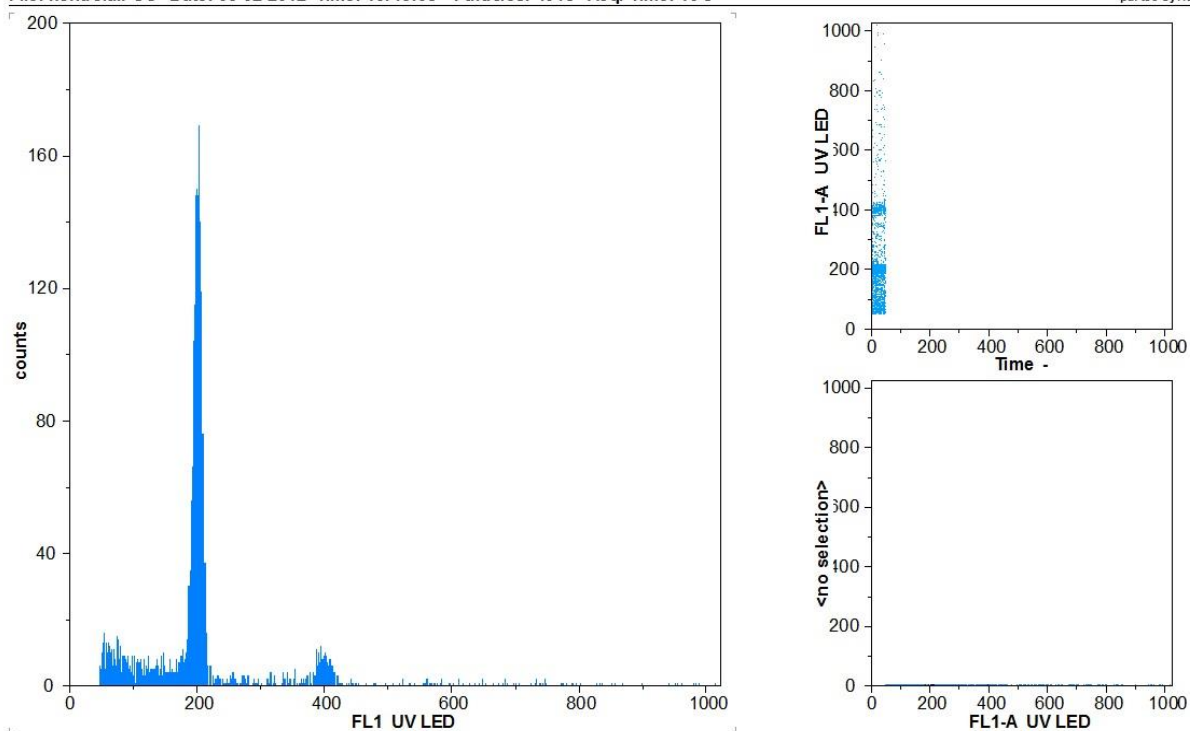
V pr tokovém cytometru bylo analyzováno v-ech 144 p effitých rostlin a 8 kontrolních rostlin. Podle výsledných histogram (Obrázek 5, Obrázek 6, Obrázek 7) byla ur ena výsledná úrove ploidie na diploidní, mixoploidní a tetraploidní. Získané diploidní rostliny byly zlikvidovány, protože m ly stejný počet chromozom jako kontrolní rostlina a tudífl je nebylo zapot ebí dále uchovávat. Získané mixoploidní a tetraploidní rostliny byly namnoženy a byly na nich pozorovány morfologické zm ny oproti kontrolní rostlin .

Ze v-ech ovlivn ných rostlin bylo získáno 8 tetraploidních a 7 mixoploidních rostlin z koncentrace 60 μ M po dobu 24 hodin, 12 tetraploidních a 7 mixoploidních rostlin z koncentrace 60 μ M po dobu 48 hodin, 33 tetraploidních a 2 mixoploidní rostliny z koncentrace 80 μ M po dobu 24 hodin, 32 tetraploidních a 3 mixoploidní rostliny z koncentrace 80 μ M po dobu 48 hodin. Celková ú innost polyploidizace byla 47,2 %. Zbylé získané údaje jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Shrnutí výsledk polyploidizace u *Solanum muricatum* Aiton

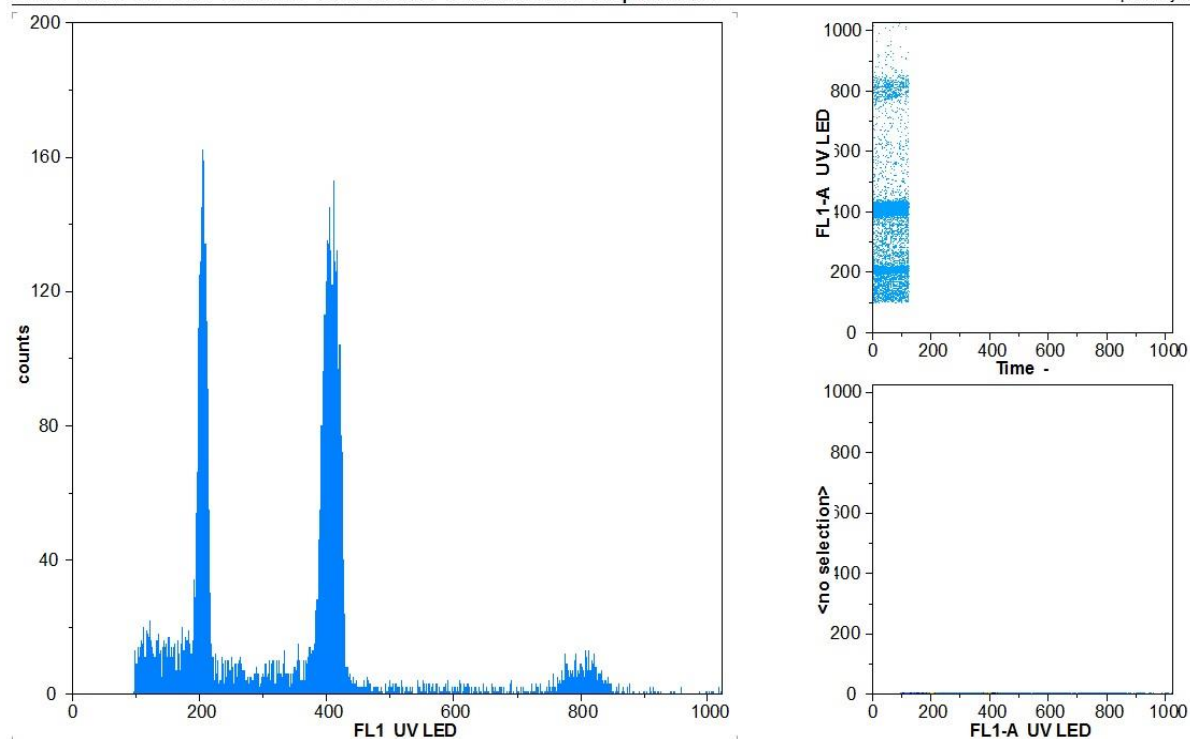
Koncentrace oryzalinu (μ M)	Po et nodálních segment	Doba p sobení (h)	Po et p effitých rostlin	Po et tetraploidních rostlin	Po et mixoploidních rostlin	Ú innost polyploidizace (%), (2n=4x)
60	45	24	37	8	7	17,8
60	45	48	29	12	7	26,7
80	45	24	38	33	2	73,3
80	45	48	40	32	3	71,1
Celkem	180	-	144	85	19	47,2

Zdroj: Autor (2022)



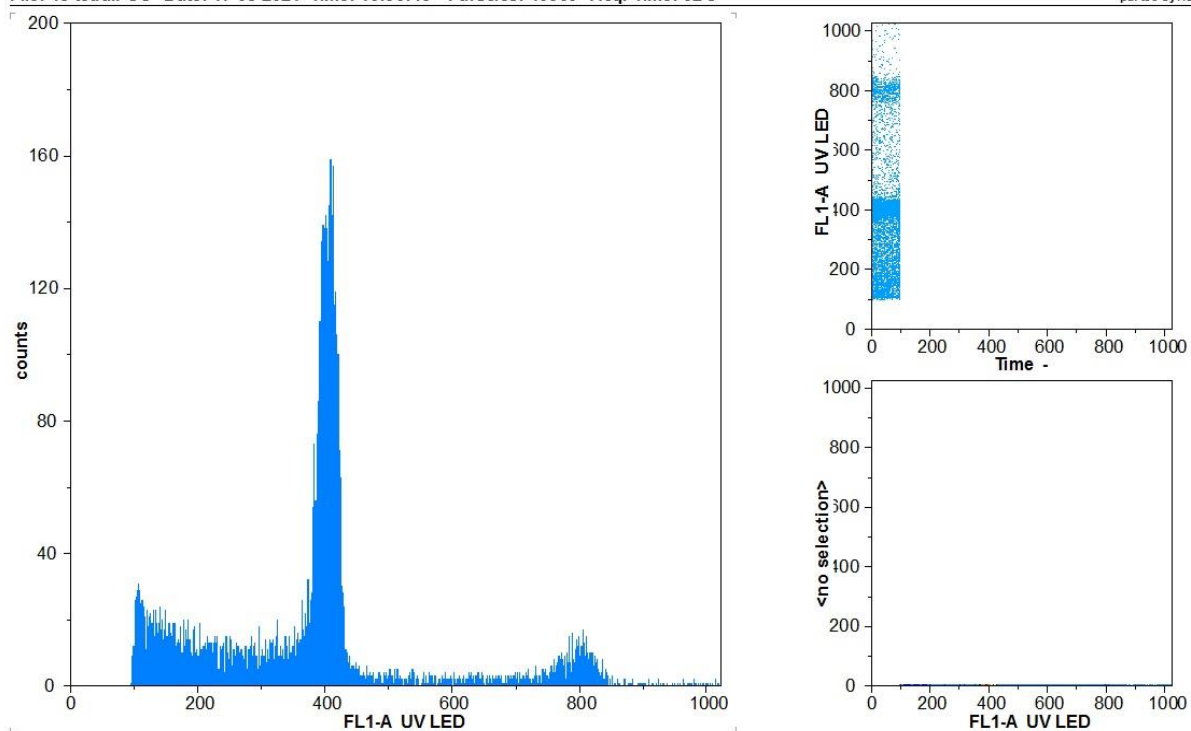
Obrázek 5: Histogram kontrolní (diploidní, $2n=2x=24$) rostliny

Zdroj: Autor (2022)



Obrázek 6: Histogram mixoploidní rostliny $60 \mu\text{M}/48\text{h}$

Zdroj: Autor (2022)



Obrázek 7: Histogram tetraploidní ($2n=4x=48$) rostliny 60 $\mu\text{M}/48\text{h}$

Zdroj: Autor (2022)

5.1 Morfologické hodnocení

Jelikož bylo získáno mnoho tetraploidních rostlin, tak bylo k pozorování vybráno pouze 6 genotypů rostlin (P28, P31, P55, P56, P64, P65). Rostliny označené P28, P55 a P56 byly z koncentrace oryzalinu 60 $\mu\text{M}/24\text{h}$ a označené P31, P64 a P65 byly z koncentrace oryzalinu 60 $\mu\text{M}/48\text{h}$.

Všechny tetraploidní rostliny měly oproti kontrolní rostlině pomalejší růst. Nejpomaleji rostl genotyp P31, která také měla nejmenší počet kořenů a listů. Nejlépe rostly genotypy P28 a P56, které měly nejdelší kořeny a největší listy (Obrázek 8). U všech tetraploidních rostlin byla nejvíce viditelná změna ve velikosti a počtu trichomů na celém povrchu rostliny. Oproti kontrolní rostlině jich měly více a byly větší. Dále byly pozorovány významné statistické rozdíly mezi kontrolní rostlinou a rostlinami tetraploidními (Tabulka 4). Nejvíce statisticky významných změn oproti kontrolní rostlině bylo zaznamenáno v počtu listů u genotypů P28, P56 a P65. Rostlina P31 se statisticky významně lišila s kontrolní rostlinou nejvíce ze všech variant, a to protože byla nejmenší a měla nejpomalejší růst.

Tabulka 4: Morfologické hodnocení tetraploidních rostlin a kontrolní rostliny po 2 m sících kultivace *in vitro* podmínkách

Rostlina/genotyp	Délka stonku (cm)	Počet kořenů	Délka nejdelšího kořene (cm)	Počet listů (cm)	Úkasklistu (cm)	Délka listu (cm)
Kontrola	13,1 ± 2,14 ^b	5 ± 0,74 ^a	8,28 ± 1,92 ^b	12,25 ± 2,38 ^{a,b}	1,23 ± 0,09 ^a	6,9 ± 1,71 ^{c,d}
P 28	13,03 ± 3,65 ^b	6,25 ± 2,01 ^a	9,33 ± 1,54 ^b	13,25 ± 1,14 ^b	1,65 ± 0,09 ^{b,c}	6,48 ± 1,14 ^{b,c,d}
P 31	5,73 ± 2,28 ^a	3,75 ± 1,14 ^a	5,1 ± 0,8 ^a	9,75 ± 1,71 ^a	1,23 ± 0,08 ^a	5,03 ± 0,51 ^{a,b}
P 55	9,7 ± 3,49 ^{a,b}	5 ± 3,22 ^a	7,08 ± 1,3 ^{a,b}	10 ± 1,48 ^a	1,48 ± 0,08 ^{a,b}	7,75 ± 0,40 ^d
P 56	9,9 ± 3,56 ^{a,b}	5 ± 1,95 ^a	9,53 ± 2,36 ^b	12 ± 1,65 ^{a,b}	1,63 ± 0,09 ^{b,c}	6,9 ± 1,47 ^{c,d}
P 64	7,68 ± 1,72 ^a	5,5 ± 3,42 ^a	6,53 ± 2,6 ^{a,b}	12 ± 1,65 ^{a,b}	1,5 ± 0,07 ^{a,b}	5,93 ± 0,46 ^{b,c}
P 65	8,88 ± 2,71 ^{a,b}	4,5 ± 1,57 ^a	9,68 ± 1,47 ^b	10,75 ± 2,49 ^{a,b}	1,93 ± 0,11 ^c	7,35 ± 0,54 ^{c,d}

* ísla oznaena stejnými písmeny (v každém sloupci) nejsou od sebe statisticky významn odliána (Kruskal-Wallis v test, $p < 0,05$)

Zdroj: Autor (2022)



Obrázek 8: Morfologické hodnocení nov získaných genotyp (P28, P31, P55, P56, P64 a P65 ó $2n=4x=48$) a kontrolní rostliny (K ó $2n=2x=24$) po 2 m sících kultivace v *in vitro* podmínkách.

Zdroj: Autor (2022)

5.2 P evod do *ex vitro* podmínek

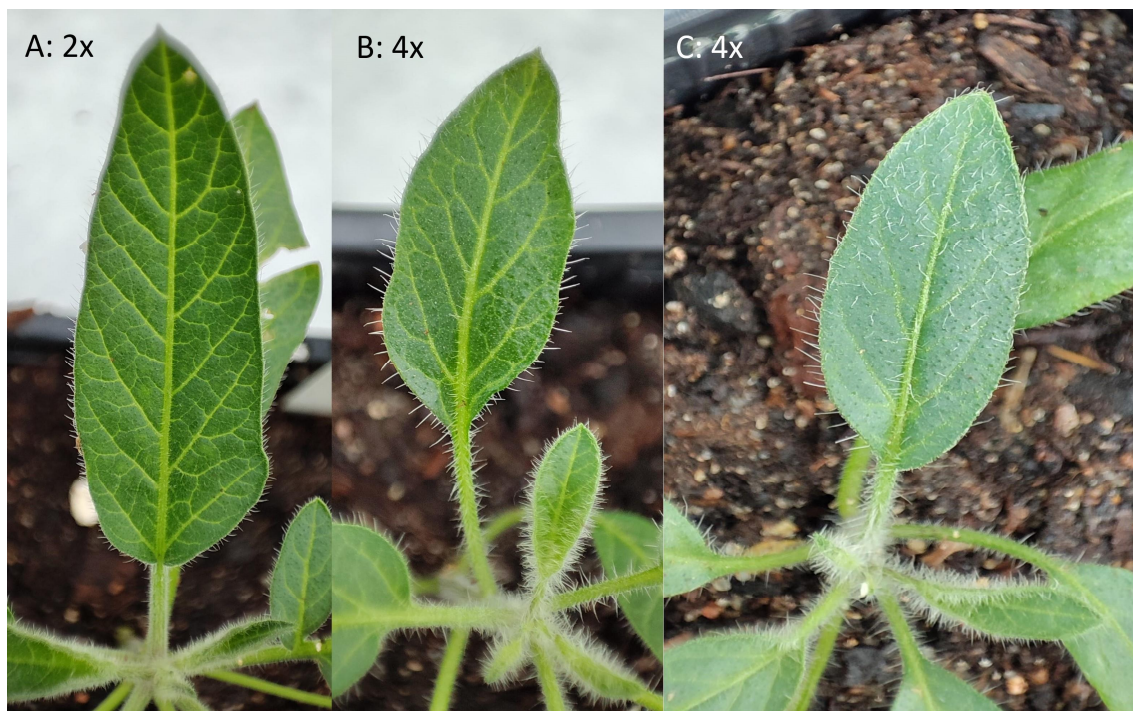
Procento přežití převedených rostlin do *ex vitro* podmínek bylo 95 %. Po 4 týdnech po převedu do skleníku vykazovaly podobný růst jako v *in vitro* podmínkách. Ve skleníku byly na rostlinách pozorovány morfologické změny. Kontrolní rostlina měla oproti tetraploidním rostlinám rychlejší růst (Obrázek 8). Dále měla kontrolní rostlina delší a ušší listy. U tetraploidních rostlin byly listy širší a kratší. Oproti kontrole měly tetraploidní rostliny více trichomů, které byly i na povrchu listů a byly v těle (Obrázek 9). Tyto morfologické změny mohou u polyploidních rostlin naznačovat vyšší obsah látek než v rostlině diploidní. Rostliny budou nadále pozorovány v *in vivo* podmínkách.



Obrázek 9: Růst rostlin po 4 týdnech po převedu do *ex vitro* podmínek:

A-B) Tetraploidní rostliny ($2n=4x=48$) a C) diploidní (kontrolní) rostlina ($2n=2x=24$)

Zdroj: Autor (2022)



Obrázek 10: Morfologický rozdíl listů diploidních (A: $2n=2x=24$) a tetraploidních rostlin (B-C: $2n=4x=48$)

Zdroj: Autor (2022)

U eledi Solanaceae byla polyploidizace provedena u řady druhů, jako je například *Solanum lycopersicum* (Cola et al. 2014), *Solanum melongena* (Külahl,olu & Çürük 2017), *Capsicum frutescens* (Pliankong et al. 2017) a *Solanum tuberosum* (Greplová et al. 2009). Ale u *Solanum muricatum* byla provedena až teprve v této práci.

Külahl,olu a Çürük (2017) zkoumali účinky různých koncentrací oryzalinu a kolchicinu na lilku vejcoplodém (*Solanum melongena*), které aplikovali v kapalném médiu. Na výhonky a stonkových pupenů aplikovali 2,5 a 3,75 mM kolchicinu po dobu 8, 16 a 32 hodin a také 28,8 a 43,2 μ M oryzalinu po dobu 12, 24 a 36 hodin. Z těchto rostlin získali celkem 4 tetraploidní rostliny: 3 rostliny v koncentraci oryzalinu 43,2 μ M po dobu působení 12 hodin a 1 rostlinu v koncentraci oryzalinu 28,8 μ M po dobu působení 36 hodin. Z těchto rostlin kolchicinem nezískali žádnou tetraploidní. Z toho vyplývá, že je oryzalin účinné antimitotické činidlo na indukci polyploidie. A zdá se být účinnější než kolchicin, který se musí aplikovat ve vyšších koncentracích a nedosahuje takové účinnosti jako oryzalin.

U řady studií na polyploidizaci rostlin z řádu Solanaceae vykazovaly získané polyploidní rostliny morfologické (větší plody, větší listy, zpomalení růstu, zvýšení biomasy, větší průduch) a biochemické (větší obsah kapsaicinu) změny (Pliankong et al. 2017; Rao et al. 2019).

Polyploidizace byla provedena také u jiných druhů různých řádů, které se shodují s dosazenými výsledky v této studii. Například byla provedena u *Cannabis sativa* Lind. Pro indukci polyploidie bylo použito antimitotické činidlo oryzalin, které působilo na explantáty axilárních pupenů po dobu 24 hodin. Nejvyšší počet tetraploidních rostlin bylo získáno z koncentrace oryzalinu 40 μM. Na získaných rostlinách byla měřena hustota trichomů na listech. Bylo zjištěno, že u tetraploidních rostlin byla hustota trichomů asi o 40 % vyšší než na listech diploidní rostliny. U tetraploidních rostlin se v listech také zvýšil obsah terpenů o 71,5 % (Parsons et al. 2019). Toto zvýšení počtu trichomů bylo také zaznamenáno i v této práci, což naznačuje, že by se mohl zvýšit obsah určitých látek i u nově získaných polyploidních genotypů *S. muricatum*.

6. Záv ry

Pomocí *in vitro* indukované polyploidie za použití antimitotického činidla oryzalinu bylo získáno 85 autotetraploidních genotypů a 19 mixoploidních genotypů, což potvrzuje první hypotézu, že je oryzalin optimálním antimitotickým činidlem pro indukci somatické polyploidie u *Solanum muricatum* Aiton. Získané autotetraploidní genotypy vykazovaly odlišné morfologické znaky oproti pěstovaným vodním diploidním rostlinám, to potvrzuje druhou hypotézu, že je polyploidizace jinou metodou k získání nových genotypů s odlišnými morfologickými znaky. Tato metoda byla u *S. muricatum* použita poprvé.

Získané polyploidní rostliny budou dále pozorovány *in vivo* podmínkách, kde bude potřeba sledovat jejich morfologické a biochemické vlastnosti. Výsledky této studie přispívají k rozšíření diverzity *S. muricatum*.

7. Reference

- Aiton W, Bauer FA, Ehret GD, Nicol G, Sowerby J. 1789. Hortus Kewensis, or, A catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew /by William Aiton .. Printed for George Nicol, Bookseller to his Majesty, London.
- Anderson GJ, Jansen RK, Youngdong K. 1996. The origin and relationships of the pepino, *Solanum muricatum* (Solanaceae): DNA Restriction fragment evidence. *Economic Botany* **50**:369-380.
- Burge GK. 1989. Fruit set in the pepino (*Solanum muricatum* Ait.). *Scientia Horticulturae* **41**:63-68.
- Campos D, Chirinos R, Pedreschi R. 2018. Bioactive potential of Andean fruits, seeds, and tubers. *Advances in food and nutrition research* **84**:287-343.
- Cavusoglu A, Sulusoglu M. 2013. In vitro propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Food, Agriculture and Environment* **11**:410-415.
- Cola GPA, Marques AM, Damasceno S, Clarindo WR, Carvalho CR. 2014. In vitro polyploidization in *solanum lycopersicum* Mill. 'Santa Cruz Kada Gigante'. *Cytologia* **79**:351-358.
- Constanza JA, et al. 2019. El cultivo del pepino dulce. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Serena.
- Contreras C, Gonzalez-aguero M, Defilippi BG. 2016. A Review of pepino (*Solanum muricatum* Aiton) fruit: A quality perspective. *HORTSCIENCE* **51**:1127-1133.
- Daunay MC, Rousselle-Bourgeois F, Lester RN, Peron JY. 1995. Known and less known *Solanum* species for fresh market. *Acta Horticulturae* **412**:293-305.
- Di Scala K, Vega-gálvez A, Uribe E, Oyanadel R, Miranda M, Vergara J, Quispe I, Lemus-mondaca R. 2011. Changes of quality characteristics of pepino fruit (*Solanum muricatum* Ait) during convective drying. *International Journal of Food Science and Technology* **46**:746-753.
- Eng W-H, Ho W-S. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae* **246**:604-617.
- Faizy WS, Toma RS, Tamer YS, Khaza'al W. 2021. Auxins and Cytokinins Involved in Micropropagation of Pepino Plant (*Solanum muricatum*Aiton). *Diyala Agricultural Sciences Journal* **13**:24-30.

- Fischer G, Magnitskiy S, Balaguera-López HE. 2021. Review on the ecophysiology of important Andean fruits: Solanaceae. *Revista U.D.C.A Actualidad* **24**.
- Greplová M, Polzerová H, Domká ová J. 2009. Intra- and inter-specific crosses of Solanum materials after mitotic polyploidization in vitro. *Plant Breeding* **128**:651-657.
- Gurung S, Chakravarty S, Chhetri B, Khawas T, Mahato SK. 2016. An introduction to pepino (*Solanum muricatum* Aiton): Review. *International Journal of Environment* **1**:143-148.
- Hernández Bermejo JE, León J. 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Herraiz García FJ. 2016. Desarrollo de herramientas morfológicas y genómicas para el estudio del pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies relacionadas. Caracterización de su valor nutracéutico [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València, València.
- Herraiz FJ, Raigón MD, Vilanova S, García-martínez MD, Gramazio P, Plazas M, Rodríguez-burruezo A, Prohens J. 2016. Fruit composition diversity in land races and modern pepino (*Solanum muricatum*) varieties and wild related species. *Food Chemistry* **203**:49-58.
- Hsu C-chin, Guo Y-ru, Wang Z-hong, Yin M-chin. 2011. Protective effects of an aqueous extract from pepino (*Solanum muricatum* Ait.) in diabetic mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**:1517-1522.
- Hsu J-Y, Hsu C-C, Chen B-C, Chen J-H, Lin H-H. 2018. Aqueous extract of pepino (*Solanum muricatum* ait) leaves ameliorate lipid accumulation and oxidative stress in alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **10**.
- Iliev I, Gajdoov A, Libiakov G, Jain SM. 2010. Plant Micropropagation. *Plant Cell Culture*:1-23. John Wiley, Chichester.
- Jha TB, Ghosh B. 2005. Plant tissue culture: basic and applied. Universities Press (India), Hyderabad.
- Jones RAC, Koenig R, Lesemann DE. 1980. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* **94**:61-68.
- Kubota C. 2001. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. *Molecular Breeding of Woody Plants, Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium (IWBS)* **18**:325-334.

- Külahl, o lu , Çürük S. 2017. Effect of Different Oryzalin and Colchicine Applications in Liquid Medium on Tetraploid Plant Production in Eggplant. *Journal of Applied Biological Sciences* **11**:42-47.
- Kumar A, Adak T, Rajan S. 2017. Pepino (*Solanum muricatum* Ait.): A potential future crop for subtropics. *Tropical Plant Research* **4**:514-517.
- Langhans M, Niemes S, Pimpl P, Robinson DG. 2009. Oryzalin bodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma: An International Journal of Cell Biology* **236**:73-84.
- Loberant B, Altman A. 2010. Micropropagation of plants. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* 1-17.
- McKinnon KM. 2018. Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology* **120**:5.1.1-5.1.11.
- Mione T, Anderson GJ. 1992. Pollen-ovule ratios and breeding system evolution in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **79**:279-287.
- Murashige T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae* **78**:17-30.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**:473-497.
- Ochatt SJ, Patat-ochatt EM, Moessner A. 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): Journal of Plant Biotechnology* **104**:329-341.
- Parsons JL, Golenia G, Boudko EA, Hepworth SR, Martin SL, James T. 2019. Polyploidization for the genetic improvement of *Cannabis sativa*. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Pauli R. 1988. Micropropagation of pepinos (*Solanum muricatum* Ait). *Acta Horticulturae* **227**:387-389.
- Pierik RLM. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Pliankong P, SuksaóArd P, Wannakrairoj S. 2017. Effects of colchicine and oryzalin on polyploidy induction and production of capsaicin in *Capsicum frutescens* L. *Pawnpirun. Thai Journal of Agricultural Science* **50**:108-120.

- Prohens J, Ruiz JJ, Nuez F. 1996. The pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): A ñNewö crop with a history. *Econ bot* **50**:355-368.
- Prohens J, Soler S, Pérez-benlloch L, Nuez F. 1998. Tomato mosaic tobamovirus, causal agent of a severe disease of pepino (*Solanum muricatum*). *Plant disease* **82**:1281-1281.
- Prohens J, Leiva-brondo M, Rodríguez-burruezo A, Nuez F. 2002. 'Puzol': A facultatively parthenocarpic hybrid of pepino (*Solanum muricatum*). *HortScience* **37**:418 - 419.
- Rao S, Kang X, Chen J, Li J. 2019. Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breeding Science* **69**:160-168.
- Rauf S, Ortiz R, Malinowski DP, Clarindo WR, Kainat W, Shehzad M, Waheed U, Hassan SW. 2021. Induced Polyploidy: A Tool for Forage Species Improvement. *AGRICULTURE-BASEL* **11**:210-225.
- Redgwell RJ, Turner NA. 1986. Pepino (*solanum muricatum*): Chemical composition of ripe fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**:1217-1222.
- Ren W, Tang DG. 1999. Extract of *Solanum muricatum* (Pepino/CSG) inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Anticancer Research* **19**:403-408.
- Riquero León RA. 2014. Industrialización del pepino dulce [Tesis de maestría]. Universidad de Guayaquil, Guayaquil.
- Rodríguez-Burruezo A, Prohens J, Nuez F. 2002. Genetic analysis of quantitative traits in pepino (*Solanum muricatum*) in two growing seasons. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**:271-278.
- Rodríguez-burruezo A, Prohens J, Nuez F. 2003. Wild relatives can contribute to the improvement of fruit quality in pepino (*Solanum muricatum*). *Euphytica* **129**:311-318.
- Rodríguez-burruezo A, Prohens J, Nuez F. 2004. 'Valencia': A new pepino (*Solanum muricatum*) cultivar with improved fruit quality. *HortScience* **39**:1500-1502.
- Rodríguez-Burruezo A, Prohens J, Fita AM. 2011. Breeding strategies for improving the performance and fruit quality of the pepino (*Solanum muricatum*): A model for the enhancement of underutilized exotic fruits. *Food Research International* **44**:1927-1935.

- Roy A, Leggett G, Koutoulis A. 2001. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports* **20**:489-495.
- Ruiz Martinez JJ, Viñals FN. 1996. El pepino dulce y su cultivo. Estudio FAO Produccion y Proteccion Vegetal, Roma.
- Ruiz JJ, Nuez F. 1997. The pepino (*Solanum muricatum* Ait.): An alternative crop for areas affected by moderate salinity. *HortScience* **32**:649-652.
- Ruiz JJ, Prohens J, Nuez F. 1997. 'Sweet Round' and 'Sweet Long': two pepino cultivars for Mediterranean climates. *HortScience* **32**:751-752.
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta: An International Journal of Plant Biology* **243**:281-296.
- Shathish K, Guruvayoorappan C. 2014. *Solanum muricatum* Ait. Inhibits inflammation and cancer by modulating the immune system. *Journal of Cancer Research* **10**:623-630.
- Song X et al. 2022. Chromosome-level pepino genome provides insights into genome evolution and anthocyanin biosynthesis in Solanaceae. *Plant Journal*:1-16.
- Sudha G, Priya MS, Shree RI, Vadivukkarasi S. 2011. In vitro free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum* aiton). *Int J Curr Pharm Res.* **3**:137-140.
- Talebi SF, Saharkhiz MJ, Raouf Fard F, Kermani MJ, Sharafi Y. 2017. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia* **70**:184-193.
- Torrent Silla D. 2014. Caracterización morfológica y molecular en pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies silvestres relacionadas. [Proyecto]. Universitat Politècnica de València, València.
- Touchell DH, Palmer IE, Ranney TG. 2020. In vitro ploidy manipulation for crop improvement. *Frontiers in plant science* **11**:722.
- Trojak-Goluch A, Kawka-Lipinska M, Wielgusz K, Praczyk M. 2021. Polyploidy in Industrial Crops: Applications and Perspectives in Plant Breeding. *AGRONOMY-BASEL* **11**:2574-2599.
- Vásquez Figueroa KY. 2021. Caracterización morfológica de pepino dulce (*Solanum Muricatum* Ait.) en la provincia de Imbabura. [Tesis de maestría]. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.

Zhao J, Simmonds DH. 1995. Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* **95**:304-309.

