

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



Diplomová práce

2017

Bc. Michal Orosz

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Izolace protoplastů plamenky latnaté
(*Phlox paniculata* L.)**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michal Orosz

Obor studia: Šlechtění rostlin

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Michal Orosz

Šlechtění rostlin

Název práce

Izolace protoplastů plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.)

Název anglicky

Isolation of perennial phlox (*Phlox paniculata* L.) protoplasts

Cíle práce

Téma je výchozím bodem pro somatickou hybridizaci spojenou s tvorbou tetraploidních genotypů, u kterých se očekává vyšší atraktivita. Hlavním cílem práce je izolovat protoplasty a odvodit prosperující buněčnou kulturu plamenky (*Phlox paniculata* L.). Dalším cílem je ověřit následující vědecké hypotézy. Hlavní vědeckou hypotéza práce předpokládá, že vypracovaná metodika pro izolaci protoplastů bramboru je s minimálními změnami aplikovatelná na vybrané kultivary rodu *Phlox*. Další hypotézou k ověření je předpoklad, že lze srovnatelně kvalitní protoplastovou kulturu odvodit z ex vitro i in vitro kultury vybraných kultivarů.

Metodika

Ex vitro listy vybraných kultivarů *Phlox* ve stáří 2 – 4 dnů a listy získané v in vitro kultuře po 30 – 40 dnech kultivace budou ve sterilních podmínkách nakrájeny na plátky <1,0 mm lehce plazmolyzovány a následně umístěny do digesčního média obsahujícího celulázy a pektinázy. Získané protoplasty budou přečištěny flotační metodou. Kultura bude vyseta na kultivační médium s přidávkem fytohormonů. Bude sledován vývoj a prováděno pasážování získaných kalusů.

Doporučený rozsah práce

Experimentální práce v rozsahu do 60 stran.

Klíčová slova

Phlox paniculata; buněčné kultury; protoplasty; regenerace in vitro.

Doporučené zdroje informací

- Bengochea, T., Dodds, J. H. 1986. Plant Protoplasts. A Biotechnological Tool for Plant Improvement. Chapman and Hall. London. 87. ISBN: 978-94-010-8317-1.
- Bříza, J., Machová, I. 1991. Regeneration of Plants from Leaf Mesophyll Protoplasts of the Tetraploid Potato Cultivars Xenia and Bintje. *Biologia Plantarum (Praha)*. 33 (3). 225-233.
- Cheng, J., Saunders, J. A. 1995. Protoplast Electrofusion and Regeneration in Potato. In: *Methods in Molecular Biology*, 55. In: *Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols*. 181–188.
- Jain, A., Rout, G. R., Raina, S. N. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. *Scientia Horticulturae*. 94. 137-143.
- Sankara Rao, K., Prakash, A. H. 1995. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*. 20 (5). 645-655.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FAPPZ

Vedoucí práce

Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a šlechtění

Elektronicky schváleno dne 12. 9. 2016

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 13. 9. 2016

prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.

Děkan

V Praze dne 20. 02. 2017

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že diplomovú prácu "Izolace protoplastů plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.)" som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry, ktorá je uvedená v zozname literatúry. Súhlasím, aby práca bola sprístupnená k študijným alebo k iným verejne prospešným účelom.

V Prahe dňa 8.4.2017

Pod'akovanie

Týmto by som chcel poďakovať školiteľovi Ing. Petrovi Sedlákovi, Ph.D. za odborné vedenie diplomovej práce, cenné pripomienky a pomoc pri získaní a spracovaní výsledkov experimentálnej časti diplomovej práce. Pod'akovanie patrí tiež celému pracovnému kolektívu laboratória Katedry genetiky a šľachtenia za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Izolace protoplastů plamenky latnaté (*Phlox paniculata* L.)

Súhrn

Phlox paniculata L. je trvalá okrasná rastlina, cenená pre svoje kvety. Patrí k druhu, ktorý je celosvetovo používaný v okrasných záhradách a parkoch v celej škále okrasných kultivarov. Má preto významný ekonomický potenciál, ktorý môže ešte vzrásť vytvorením somatických hybridov s predpokladanou vysokou estetickou atraktivitou.

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo vyizolovať protoplasty a následne odvodiť prosperujúcu bunkovú kultúru *Phlox paniculata*. Protoplastové kultúry boli odvodené z *ex vitro* a *in vitro* donorového materiálu. Počas pokusov bol porovnávaný vplyv lyofilizovaných a tekutých enzýmov v procese izolácie, vplyv veku donorového materiálu na výťažok a následnú životaschopnosť a použitie antioxidantu PVP na viabilitu izolovaných protoplastov.

Podarilo sa odvodiť protoplastovú kultúru s bunkami v predlžovacom raste. K úspešnej izolácii protoplastov s najväčším výťažkom viabilných protoplastov bolo použité digesčné médium obsahujúce tekuté enzýmy Cellulase (*Trichoderma reesei* Simmons) v koncentrácii 1 % a Pectinase (*Aspergillus aculeatus* Iizuka) v koncentrácii 1,5 %, osmotikum 0,45 M manitol a 15 g.l⁻¹ PVP-10. Po resyntéze bunkovej steny protoplasty najlepšie reagovali na médiá, kde bol ako cytokinín použitý BA, alebo Kinetin a auxín IAA v koncentráciách 0,25 a 0,5 mg.l⁻¹.

Aj napriek pozorovaniu protoplastov v predlžovacej fáze rastu nenastalo ani po 25 dňoch kultivácie delenie buniek. Je možné sa preto domnievať, že druh *Phlox paniculata* L. je obzvlášť citlivý na koncentrácie exogénne dodaných fytohormónov.

Kľúčové slová: *Phlox* L., *Phlox paniculata* L., izolácia protoplastov, mezofyl, somatická hybridizácia.

Isolation of perennial phlox (*Phlox paniculata* L.) protoplasts

Summary

Phlox paniculata L. is a perennial ornamental plant prized for their flowers. Belongs to the most recognizable and popular perennials species planted worldwide in ornamental gardens and the parks in the whole rock ornamental cultivars. Therefore it has significant economic potential that may still grow by creating somatic hybrids with expected high aesthetic attractiveness.

The main objective of the thesis was to isolate protoplasts and subsequently derive prosperous *Phlox paniculata* L. cell culture. Protoplast cultures were derived from *ex vitro* and *in vitro* donor materials. During the tests the effect of the lyophilized and liquid enzymes in the process of isolation was compared, as well as the effect of age of the donor material on the yield and the subsequent viability and use of antioxidant PVP on the viability of isolated protoplasts.

It managed to derive the protoplast culture of cells in an extension growth. To successful isolation of protoplasts with the highest yield of viable protoplasts digestion liquid medium containing the liquid enzyme Cellulase (*Trichoderma reesei* Simmons) with concentration 1% and Pectinase (*Aspergillus aculeatus* Iizuka) with concentration 1.5%, an osmotic agent 0.45 M mannitol and 15 g.l⁻¹ PVP-10 was used. After the salvage pathway of the cell wall the protoplasts best responded to the media where BA or Kinetin as cytokinin and auxin IAA with the concentrations 0.25 and 0.5 mg.l⁻¹ were used.

Despite the observation of protoplasts in the extension phase of growth, cell division did not occur even after 25 days of cultivation. It can therefore be considered that the species *Phlox paniculata* L. is particularly sensitive to the concentrations of exogenous phytohormones.

Keywords: *Phlox* L., *Phlox paniculata* L., the isolation of protoplasts, mesophyll, somatic hybridization.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Hypotézy a ciele práce	2
3. Literárny prehľad	3
3.1. <i>Phlox paniculata</i> L.....	3
3.1.1. Biologická klasifikácia.....	3
3.1.2. Botanická charakteristika rodu <i>Phlox</i> L.....	3
3.1.3. Popis druhu <i>Phlox paniculata</i> L.	3
3.1.4. Množenie <i>Phlox</i> L.....	5
3.2. Regeneratívna schopnosť rastlín.....	5
3.3. Tvorba bunkovej steny	6
3.3.1. Zloženie bunkovej steny	6
3.4. Reaktívne formy kyslíka	7
3.4.1. Reaktívne formy kyslíka v procese regenerácie protoplastov a bunkovej steny	8
3.5. Superoxid dismutáza	8
3.6. Katalázy a peroxidázy	9
3.7. Reakcia protoplastov na fytohormóny	10
3.8. Výber rastlinného pletiva	11
3.9. Spôsoby izolácie protoplastov.....	12
3.9.1. Mechanická izolácia	12
3.9.2. Enzymatická izolácia	12
3.10. Postup enzymatickej izolácie.....	13
3.11. Agens zapojené do izolácie protoplastov	16
3.11.1. Donorový materiál	16
3.11.2. Overenie životaschopnosti protoplastov.....	17
3.11.3. Posúdenie výnosu izolácie protoplastov.....	17

3.11.4.	Kultivácia protoplastov a ich nároky na živiny	18
3.11.5.	Koncentrácia protoplastov v kultivačných médiách	20
3.12.	Typy kultivačných médií	20
3.12.1.	Tekuté médiá.....	20
3.12.2.	Pevné médiá	21
4.	Materiál a metódy	23
4.1.	Biologický materiál.....	23
4.2.	Sterilizácia biologického materiálu	23
4.3.	Metódy izolácie protoplastov	23
4.3.1.	Metóda izolácie podľa Cheng a Sounders (1995)	23
4.3.2.	Zrýchlená metóda izolácie	26
4.4.	Stanovenie výťažku protoplastov	26
4.5.	Stanovenie viability protoplastov	26
4.6.	Kultivácia protoplastov	27
4.6.1.	Kultivácia na tekutých médiách	28
4.6.2.	Kultivácia na alginátových médiách.....	28
4.6.3.	Vyhodnotenie výsledkov pokusov.....	30
5.	Výsledky	31
5.1.	Vplyv veku donorového materiálu na izoláciu protoplastov	31
5.2.	Porovnanie výťažku protoplastov vzhľadom na použité enzýmy	34
5.3.	Vplyv antioxidantov v digesčnom médiu	37
5.4.	Vplyv fytohormónov na kultiváciu protoplastov.....	38
5.5.	Použitie alginátu sodného.....	38
6.	Diskusia.....	40
6.1.	Faktory ovplyvňujúce izoláciu protoplastov	40
6.1.1.	Druh enzýmu	40
6.1.2.	Vek donorového materiálu	40

6.2.	Faktory ovplyvňujúce viabilitu protoplastov	41
6.2.1.	Koncentrácia antioxidantov.....	41
6.3.	Faktory ovplyvňujúce kultiváciu protoplastov.....	42
6.3.1.	Vplyv fytohormónov v kultivačnom médiu.....	42
7.	Záver	43
8.	Prehľad použitej literatúry.....	44
9.	Zoznam skratiek	51
10.	Zoznam obrázkov	52
11.	Zoznam tabuliek	53

1. Úvod

Protoplastom sa nazýva bunka rastlín, húb, alebo bunka bakteriálna, u ktorej bola odstránená bunková stena. Bunková stena bola v minulosti odstraňovaná mechanicky, v súčasnosti je táto metóda využívaná len zriedka a protoplasty sú prakticky výhradne izolované pomocou lytických enzýmov. Celulázovými enzýmami je rozkladaná celulóza v bunkových stenách rastlín, zatiaľ čo enzýmami zo skupiny pektináz sú degradované pektíny držiace bunky pohromade. Použitie lytických enzýmov umožňuje izoláciu veľkého množstva protoplastov z celej rady rastlinných druhov.

Degradácii bunkových stien zvyčajne predchádza inkubácia v osmoticky aktívnom roztoku, ktorý navodí plazmolýzu buniek, vďaka čomu sú bunkové steny ľahšie degradované. Následne sa nerozložené časti tkanív filtrujú a protoplasty sú odstredené za vzniku peliet. Ak sú protoplasty umiestnené na médium, ktoré obsahuje fytohormóny, dochádza k ich rediferenciácii a môžu z nich vzniknúť akékoľvek rastlinné pletivá.

Materiálom vhodným k izolácii protoplastov sú kultúry *in vitro* ako aj kultúry *ex vitro*. Z rastlinných orgánov sú všeobecne vhodné rôzne časti rastlín, najčastejšie to bývajú bunky listového mezofylu, mladých hypokotýlov, prípadne kalusov.

Metódou fúzie protoplastov je možné spojiť genetickú informáciu doposiaľ inkompatibilných druhov. Fúzia protoplastov tiež umožňuje medzidruhový a vnútrodruhový prenos mitochondriálnej DNA, prenos chloroplastov, ako aj samotnej cytoplazmy, štúdium funkcie a vývoja rastlín, štúdiá expresie a lokalizácie DNA, RNA a bielkovín. Metóda somatickej hybridizácie bola vo svete aplikovaná v celej rade kultúrnych druhov a tak bol potvrdený prenos nových kvalitatívnych a kvantitatívnych znakov.

Táto práca sa zaoberá izoláciou protoplastov z *Phlox paniculata* L., ktorých následnou fúziou môžu vzniknúť atraktívne okrasné kultivary.

2. Hypotézy a ciele práce

Hlavné vedecké hypotézy diplomovej práce sú:

- Známa metodika izolácie protoplastov rodu *Solanum* je použiteľná pre izoláciu protoplastovej kultúry rodu *Phlox*.
- Je možné odvodiť kvalitou porovnateľnú kultúru z donorového materiálu pochádzajúceho z *ex vitro* ako aj *in vitro* kultúr.

Hlavnými cieľmi práce bolo vyizolovať životaschopné protoplasty druhu *Phlox paniculata* L., z nich následne odvodiť prosperujúcu kultúru buniek a zhodnotiť kvalitu protoplastov izolovaných z kultúr *ex vitro* a *in vitro*.

3. Literárny prehľad

3.1. *Phlox paniculata* L.

3.1.1. Biologická klasifikácia

- ❖ Ríša: *Plantae* (rastliny)
- Podríša: *Tracheobionta* (cievnaté rastliny)
- Oddelenie: *Magnoliophyta* (magnóliorasty)
- Trieda: *Magnoliopsida* (dvojkličnolistové)
- Rad: *Polemoniales* (vojnovkotvaré)
- Čeľaď: *Polemoniaceae* (vojnovkovité)
- Rod: *Phlox* (Flox)
- Druh: *Phlox paniculata* L. (Flox metlinatý L.)

(Novák a Skalický, 2012)

3.1.2. Botanická charakteristika rodu *Phlox* L.

Rod *Phlox* zahŕňa 70 druhov trvaliek a jednoročných rastlín kobercovitého, alebo vzpriameného rastu jednoročných rastlín a kríkov, ktoré sa pôvodne vyskytujú v Severnej Amerike. Floxy sú pestované predovšetkým pre svoje výrazné kvety, vyrastajúce na metlinatých vrcholkoch, alebo chocholíkoch. Lievikovitá koruna zložená z úzkej trubky, sa otvára do piatich plochých korunných lupienkov vajcovitého tvaru. Kvetné lupienky bývajú niekedy usporiadané hviezdovito. Plodom je troj-puzdrá tobolka. Listy sú protistočné, v hornej časti stonky niekedy striedavé, sediace, celistvé, vajcovité, kopijovité až ihlicovité, čepeľ listu na okraji hladká (Kubitzki et al., 1993).

Iné druhy, ktoré pochádzajú zo suchých oblastí, kvitnú prevažne začiatkom roka na jar a začiatkom leta. Druhy s vysokou stonkou často okolo jedného metra, kvitnú od leta do jesene (Brickell, 2008).

3.1.3. Popis druhu *Phlox paniculata* L.

Phlox paniculata L. je jeden z dvoch najbežnejších pôvodných druhov floxu. *Phlox paniculata* L. ako aj *Phlox divaricata* L. boli prvýkrát objavené vo Virgínii v druhej polovici 17. storočia. Názov *Phlox* v gréckom preklade „oheň“ alebo „plameň“ bol pravdepodobne odvodený podľa farby kvetných lupeňov. Vedeckým synonymom tejto

rastliny je *Phlox decussata* Purch., v anglicky hovoriacich krajinách známa tiež pod názvom „Flame Flower“ alebo „Summer Phlox“.

Výška: Trvalka dorastajúca do výšky od 60 do 180 cm.

Stonka: Je pevná, hladká a vzpriamená.

Listy: Jednoduché, protistojné, na stonke je zvyčajne 15-40 párov listov. Každý list je krátko stopkovitý častejšie ale sediaci, neobvíjajúci stonku. Kopijovito predĺžený, oválny alebo vajcovitý; približne od 5 do 15 cm dlhý a od 2,5 do 5 cm široký, najširší uprostred. Okraje listov sú celistvé. Žilnatina perovitá.

Kvety: Kvety sú osovo symetrické od 1 do 2,5 cm široké a približne 2,5 cm dlhé s krátkou stopkou, usporiadané vo veľkom, hustom, strapcovitom súkvetí bielej, ružovej, červenej až po fialovú farbu. Repicovitá kvetná koruna je tvorená piatimi okvetnými lístkami, obklopená piatimi hladkými kalištnými lístkami. Kvet obsahuje 5 krátkych, krémovo bielych tyčínok, jeden krátky piestik, blizna je delená na tri lineárne blizny.

Typicky voňajúce kvety lákajú rôzne druhy hmyzu prevažne motýle, čmeliaky rodu *Bombus* a kolibríky (*Archilochus colubris* L.). Kvety floxov kvitnú od júna do októbra, výnimočne až do začiatku zimy.

Plody: Plodom je pukavá tobolka delená na tri samostatné pozdĺžne púzdra.

Korene: Koreňový systém je plytký, dobre vetvený.

Stanovisko: *Phlox paniculata* L. rastie na vlhších stanoviskách otvorených lesov, húštin, kamenistých riečnych brehov s dobrou zásobou živín.

Rozšírenie: Rozšírenie zahŕňa prevažnú časť východu USA s výnimkou Floridy a juhovýchodnej Kanady.

Využitie: Okrem okrasných účelov je využívaný v ľudovej medicíne, kde je extrakt z listov užívaný ako laxatívum. Alebo povrchovo pri liečbe celej rady ekzémov, vredov a ďalších kožných ochorení. Niekedy sa listy užívajú formou nálevu pri ochoreniach žalúdka. Odvar z koreňov bol využívaný k výplachu podráždenej očnej sliznice (Böhm, 1991; Brickell, 2008; Locklear, 2011).

Kultúrne floxy sú využívané ako vysoko adaptabilné okrasné rastliny. V súčasnosti je vyšľachtené množstvo okrasných kultivarov, ktoré majú pôvod práve v *Phlox paniculata* L., ktorý je tiež možné hybridizovať s inými druhmi *Phlox* L. (Locklear, 2011).

3.1.4. Množenie *Phlox* L.

Floxy sa najčastejšie množia vegetatívnou cestou, čo umožňuje udržiavanie požadovaných vlastností hybridných odrôd delením trsov, pomocou rezov nodálnych segmentov s listami či koreňovými rezmi. Množenie generatívnou metódou semenami je menej časté a v botanickej praxi využívané hlavne v procese šľachtenia, alebo pri jednoročnom druhu *P. Drummondii* Hook. (Böhm, 1991).

Ďalšou z metód kultivácie je množenie pomocou *in vitro* kultúr. Táto metóda je veľmi prínosná v šľachtení pri uchovávaní vzácných kultivarov, ako aj ozdravovaní rastlinného materiálu od vírových ochorení.

3.2. Regeneratívna schopnosť rastlín

Protoplast je bunka rastlín, húb, alebo bunka bakteriálna, zbavená bunkovej steny, ktorej povrch je krytý len plazmatickou membránou. Cocking (1960) už pred pol storočím použil enzým celulózu na izoláciu protoplastov z koreňových špičiek sadeníc rajčín. Od tej doby bolo vyvinutých mnoho metód pre izoláciu protoplastov z rôznych tkanív a rastlinných druhov (Crowder et al., 1979; Evans a Bravo, 1983; Gamborg et al., 1975, Nagata a Takebe, 1971). Spočiatku bola bunková stena odstraňovaná mechanicky, nasekaním parenchýmu v osmotickom médiu. Nízka výťažnosť tejto metódy bola ďaleko prekonaná, metódou enzymatickej izolácie.

Vplyvom odstránenia bunkovej steny protoplasty vstupujú do dediferencovaného stavu a za pôsobenia fytohormónov môžu rediferencovať v akékoľvek pletivo. Neprítomnosťou bunkovej steny, mechanickej opory bunky, je možné navodiť proces fúzie buniek. Jej absencia uľahčuje proces transformácie jadrovej DNA, čo stavia protoplasty na popredné priečky v procese šľachtenia pri tvorbe cybridov, somatických hybridov, ale aj pri výskume bunkovej rediferenciácie (Davey et al., 2005). Protoplasty sa tiež stali univerzálnym nástrojom v štúdiu *in vivo* funkcie a vývoja rastlín. Protoplasty ľahko prijímajú malé molekuly a tak uľahčujú prístup fluorescenčných farbív, čo umožňuje vyššie rozlíšenie subcelulárnych štruktúr. Tak umožňujú štúdium expresie a lokalizácie DNA, RNA, bielkovín. Štúdium subcelulárnej lokalizácie proteínov (Pitzschke a Persak, 2012), interakcie proteín - proteín (Chen a Gallie, 2004).

V procese odstránenia, ako aj vytvárania bunkovej steny sú rastlinné bunky vystavené zvýšeným koncentráciám (ROS) reaktívnych foriem kyslíka, medzi ktoré patrí peroxid vodíka, hydroxylové a superoxidové radikály. Oxidatívny stres spôsobovaný týmito zložkami sa rastlinný protoplast snaží kompenzovať zvýšením tvorby antioxidantov, alebo zvýšenou tvorbou enzýmov, a to prevažne kataláz a superoxid dismutáz, ktoré katalyzujú voľné kyslíkové radikály (O'Neill a Mathias, 1993).

Schopnosť rastlín regenerovať, je do istej miery určená plasticitou dediferencovaných somatických buniek, čo sa využíva v organogénzii. Somatické bunky sú schopné dediferenciácie, regenerácie a tak umožňujú vznik akéhokoľvek typu rastlinného pletiva v závislosti na expresii rôznych génov. Táto schopnosť je potlačená len u špecializovaných pletív, napr. pletív vzdušnic, kde je protoplast úplne eliminovaný, alebo pri bunkách sitkovic, v ktorých jadro degeneruje. Proces dediferenciácie je spojený so zmenami expresie génov, pričom bunky exprimujú gény nutné pre rediferenciáciu v iný typ pletív, prípadne je navodený proces apoptózy (Steeves a Sussex, 1989).

3.3. Tvorba bunkovej steny

3.3.1. Zloženie bunkovej steny

Resyntéza bunkovej steny protoplastov je základným predpokladom pre znovuoobnovenie všetkých prirodzených funkcií bunky. Bunková stena je pevnou štruktúrou priliehajúcou na vonkajšiu stenu protoplastu a je štruktúrou určujúcou konečný tvar a veľkosť bunky (Cosgrove, 2001). Jej hlavnou zložkou sú polysacharidy a proteíny. Majú ju takmer všetky rastlinné bunky, nenachádza sa iba v bunkách spermatických, niekedy v bunkách vaječných. Okrem ochranných a mechanických funkcií má významnú úlohu pri delení, raste a diferenciácii buniek, tiež plní významnú úlohu pri transporte látok v rastlinách. Jej chemické zloženie je závislé na rastlinnom druhu, type pletiva, ale tiež na vnútro druhovej genetickej variabilite. Zmeny v štruktúre a zložení bunkovej steny môžu byť použité pri identifikácii jednotlivých typov buniek pri skúmaní rôznych biochemických procesov, napríklad diferenciácii, raste, pri biotickom a abiotickom strese (Cosgrove, 2005).

Tri vrstvy bunkovej steny je možné rozdeliť podľa spôsobu utvárania, štruktúry a funkcie. Prvou z vrstiev v smere od extracelulárneho priestoru je stredná lamela, ktorá vzniká už v telofáze bunkového delenia, splynutím váčkov z Golgiho aparátu obsahujúcich prevažne pektíny. Ďalšiu z vrstiev vytvára primárna stena, spočiatku pružná, následne sa

stáva v procese ontogenézy plastickou. Vzniká zo sekreторických váčkov exocytózou z Golgiho aparátu (Luštinec a Žárský, 2005). Prevažujúcu zložku bunkovej steny tvorí celulóza, je určujúca pre architektúru bunky. Je v nej zastúpená z 25-50 %, chemicky ide o lineárne usporiadané polysacharidy glukózy viazané β -1,4 väzbou. Tieto dlhé tenké celulózové makromolekuly sa spájajú do zväzkov zvaných celulózové mikrofibrily, ktoré majú priemer 10-25 nm. Sú hydrolyticky štiepené celulázami a syntetizované celulázyntázou transversálne uloženou v cytoplazmatickej membráne. Sekundárna bunková stena vzniká ukladaním prevažne celulózy a lignínu pod primárnu stenu bunky. Lignín dodáva bunkovej stene odolnosť „zdrevnatením“ za cenu zníženej pružnosti. Jedná sa o vysokomolekulárnu organickú látku vznikajúcu z tyrozínu, ktorý ale neobsahuje dusík.

Dnes je známe množstvo proteínov, ktoré sa podieľajú na katalytických reakciách spojených so syntézou polysacharidov bunkových stien, ako aj proteíny podieľajúce sa pri jej stavbe. Jedným z najdôležitejších proteínových komplexov je komplex celuláz a syntéz zabezpečujúcich tvorbu základných stavebných prvkov (Watanabe et al., 2015).

3.4. Reaktívne formy kyslíka

Pôsobením stresových faktorov, ako je proces odstránenia bunkovej steny môže vyvolať u rastlín oxidatívny stres, charakteristický tvorbou veľkého množstva reaktívnych foriem kyslíka (Mittler, 2002; Scandalios, 2005). Dochádza k narušeniu rovnováhy medzi produkciou a odbúraním ROS (Neill et al., 2002). Produkciou singletového kyslíka je stimulovaný vznik ďalších aktívnych foriem kyslíka, ako peroxidu vodíka (H_2O_2), superoxidového ($O_2^{\cdot-}$), alebo hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}) (Vranová et al., 2002). Ich tvorba začína aktiváciou molekulárneho kyslíka (O_2) prenosom energie, napr. zo slnečného žiarenia v procese fotosyntézy, kde dochádza k tvorbe singletového kyslíka (1O_2). Ten je postupne redukovaný na superoxidový radikál, hydroxylový radikál, peroxid vodíka až do konečnej fázy vody (Piterková et al., 2005).

Tieto vysoko reaktívne molekuly, prevažne však hydroxylový radikál, pôsobia deštruktívne na nukleové kyseliny, lipidy a proteíny. Reaktívne formy kyslíka nepôsobia len toxicky, plnia tiež rolu signálnych molekúl kontrolujúcich obranné procesy rastlinného organizmu a zastupujú významnú úlohu v procese programovanej apoptózy (Vacca, 2004). Pre rastliny je preto veľmi dôležité držať v bunke redoxnú rovnováhu, takzvanú homeostázu (Piterková et al., 2005).

Ochranou pred oxidatívnym poškodením reaktívnymi formami kyslíka zaisťuje v bunkách rada antioxidantných systémov lokalizovaných v rôznych bunkových štruktúrach. Medzi najúčinnšie antioxidanty patrí askorbát, β -karotén, redukovaný glutathion a α -tokoferol (Chen a Gallie, 2004) a rôzne špecializované enzýmy, ako superoxid dismutáza, peroxidáza, kataláza a enzýmy askorbát-glutathionového cyklu (Alscher et al., 2002; Piterková et al., 2005).

3.4.1. Reaktívne formy kyslíka v procese regenerácie protoplastov a bunkovej steny

Proces enzymatického odstránenia bunkovej steny a s ním spojený zvýšený metabolizmus sacharidov sú zdroje superoxidových radikálov, ktoré sú v procese následnej regenerácie potrebné. V metabolickej podobe vzniknutý peroxid vodíka napomáha vzniku bunkovej steny ako substrát peroxidáz, ktoré regulujú tvorbu štruktúrnych proteínov bunkovej steny, ako napríklad suberin a lignín (Papadakis et al., 2002). Pri rozklade makromolekulových látok bunkovej steny bol detekovaný vo zvýšenej miere hydroxylový radikál OH^\cdot , ktorý napomáha pri reorganizácii bunkovej steny behom delenia a rastu. Čo umožňuje práve plasticita bunkovej steny, spôsobená činnosťou peroxidáz. Narušenie rovnováhy medzi koncentráciou antioxidantov a reaktívnych foriem kyslíka v protoplastoch väčšinou spôsobí zastavenie delenia a následného vývoja (Papadakis et al., 2002).

Lokalizácia peroxidu vodíka v bunke je významným faktorom pri znášaní oxidatívneho stresu. Zatiaľ čo je H_2O_2 v cytoplazme toxický, je peroxid vodíka v apoplastickom priestore nevyhnutný pre delenie buniek a syntetizovanie bunkovej steny. V pokusoch De Marca a Roubelakis-Angelakis (1996), kde inhibovali činnosť askorbát peroxidázy sa protoplasty prestali vyvíjať do štyroch dní kultivácie a následne odumreli. Pokusy inhibujúce činnosť kataláz, ktoré riadia odbúravanie apoplastického peroxidu vodíka nemali preukázateľný vplyv na delenie a životaschopnosť protoplastových kultúr. Ale prídavok kataláz v kultivačnom médiu inhiboval delenie buniek a viedol k degradácii kultúry (De Marco a Roubelakis-Angelakis, 1996).

3.5. Superoxid dismutáza

Prvou odozvou rastlinnej bunky na zvýšenú prítomnosť superoxidových radikálov je katalýza O_2^\cdot pomocou superoxid dismutázy (SOD) na menej toxický peroxid vodíka. Podľa povahy kovového kofaktoru je možné rozdeliť enzýmy superoxid dismutáz od triedy

obsahujúce kofaktor Fe, Mn alebo Cu a Zn (Bowler et al., 1992). Kliebenstein et al. (1998) skúmali aktivitu superoxid dismutázy u *Arabidopsis thaliana* L., zaradili nájdené izoenzýmy do troch tried podľa kovového prvku tvoriaceho kofaktor. FeSOD - kofaktory, ktoré viažu železo (FSD1, FSD2, FSD3), MnSOD - kofaktory, ktoré viažu mangán a Cu-ZnSOD - kofaktory, ktoré viažu meď alebo zinok (CSD1, CSD2, CSD3). Na základe pokusov bolo tiež zistené, že izoenzýmy FeSOD sa špecificky vyskytujú v plastidoch, izoenzýmy MnSOD v mitochondriách a Cu-ZnSOD boli lokalizované v najväčšej miere v cytoplazme a plastidoch, ale tiež vo vakuolách a extracelulárnom priestore a sú hlavnou skupinou superoxid dismutázy (Bowler et al., 1992; Kliebenstein et al., 1998).

Kliebenstein et al. (1998) potvrdili štúdiom exprese génov vplyv intenzity svetla na nárast proteínu FSD1, čo vypovedá nielen o jeho lokalizácii v chloroplastoch, ale aj o vplyve intenzity svetelného žiarenia, ktorá je najväčšia v obedňajších hodinách. V kultúrach tabaku kultivovaných bez prístupu svetla dochádzalo k znižovaniu koncentrácie izoenzýmov skupiny FeSOD a ich postupnej degradácii (De Marco a Roubelakis-Angelakis, 1996).

3.6. Katalázy a peroxidázy

Vzniknutý peroxid vodíka je následne enzymaticky štiepený enzýmami skupín kataláz a peroxidáz.

Katalázy *Arabidopsis thaliana* L. sú determinované tromi génmi, ktoré sa označujú CAT1, CAT2, CAT3. Gény CAT1 a CAT2 sú indukované svetlom, expresia génu CAT2 a CAT3 je navyše ovplyvňovaná cirkadiálnymi rytmami. Katalázy sa nevyskytujú voľne v cytoplazme, nachádzajú sa na organelových membránach a to prevažne membránach mitochondrií a peroxizómov, kde katalyzujú rozklad molekuly H_2O_2 , ktorý prevažne vzniká pri β -oxidácii mastných kyselín v špecializovaných peroxizómoch nazývaných glyoxyzómy. Ďalším významným prirodzeným zdrojom vzniku peroxidu vodíka je proces elektrónového transportu v mitochondriách (McClung, 1997).

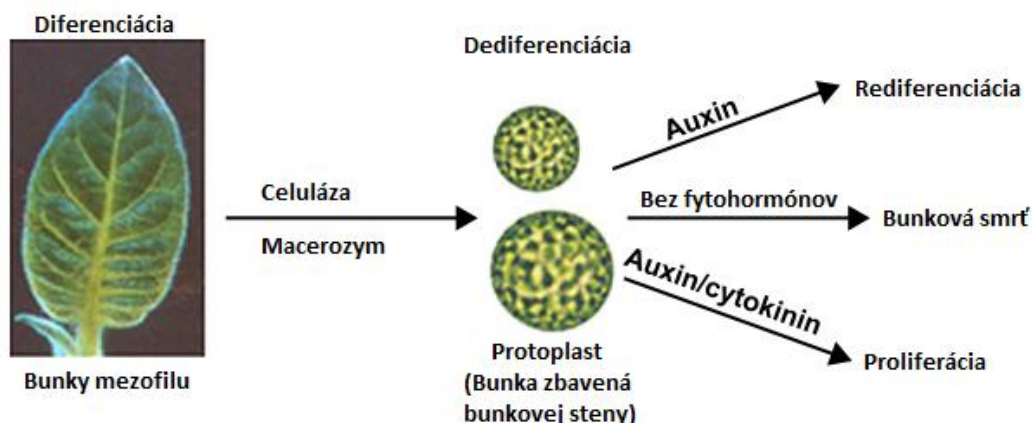
V procese enzymatického rozkladu bunkovej steny pozorovali De Marco a Roubelakis-Angelakis (1996) rastúcu koncentráciu kataláz, ktorú po prenesení kultúr na kultivačné médium pozvoľna nahradilo zvýšené množstvo askorbát peroxidázy. To potvrdzuje teóriu, že zvýšená hladina askorbát peroxidázy na úkor kataláz je tesne pred vytvorením bunkovej steny kľúčová pri odvodení životaschopnej protoplastovej kultúry.

3.7. Reakcia protoplastov na fytohormóny

Jednou z podmienok pre udržanie životaschopnej kultúry rastlinných protoplastov je prítomnosť fytohormónov, auxínov a cytokinínov v kultivačnom médiu. Bez nich by protoplasty nevstúpili do bunkového cyklu vrcholiacom v proces delenia (Obrázok 1). Fytohormóny zastávajú hlavnú úlohu v procese regulácie vývojových fáz rastlín a sú nenahraditeľné pri ovplyvňovaní bunkového delenia v podmienkach *in vitro* (Das et al., 1956; Dhillon a Miksche, 1981).

Protoplasty vyizolované z mezofilových buniek sa nachádzajú prevažne vo fáze G₀ bunkového cyklu. Carle et al. (1998), ktorí pracovali s kultúrami tabakových protoplastov zistili, že k deleniu dochádza už po 42 hodinách od izolácie a to len v prípade, že médium obsahovalo auxíny a cytokiníny. Médiá s absenciou jedného z fytohormónov vykazovali len minimálny počet deliacich sa buniek. Prítomnosť auxínov je vyžadovaná u tabakových protoplastov ihneď od izolácie, prítomnosť cytokinínov je potrebná približne po 6 hodinách od izolácie. Vstup do S fázy bunkového cyklu je sprevádzaný zvyšovaním expresie génov kódujúcich cyklín-depenentné kinázy, prevažne Cdk2, a to už po 12 hodinách kultivácie. Po 18 hodinách stúpa aj expresia génu kódujúci histon H3 (Carle et al., 1998).

V prípade pokusov Pasternaka et al. (2002) s lucernou siatou (*Medicago sativa* L.), ktorí poukazujú na rôzne koncentrácie auxínov v spojitosti s látkami indukujúcimi stres. Protoplasty kultivované pri koncentrácii 1 μM auxínu 2,4-D vykazovali štyri dni po izolácii výrazné zvyšovanie objemu vakuoly a predlžovací rast, následne veľká časť týchto protoplastov odumrela za predpokladu, že neboli prenesené na médium s cytokinínmi. Po kultivácii protoplastov na médiu s koncentráciou auxínu 10 μM 2,4-D zostávali protoplasty okrúhle, mali väčšie množstvo menších vakuol obsahujúcich prevažne proteíny a nemali tendencie k asymetrickému deleniu. Protoplasty, kultivované pri nízkej koncentrácii auxínov v spojení so železom v podobe 1 mM Fe-EDTA vykazovali podobnú stavbu. Pridanie železa do kultivačných médií v prvých troch dňoch po izolácii podporuje aktivitu askorbát peroxidázy, ktorá hlavne redukuje vznik oxidatívneho stresu, ktorý je jeden z hlavných príčin dediferenciácie. Vysoké koncentrácie Fe alebo auxínov inhibujú delenie a tvorbu kalusov aj za predpokladu, že protoplasty prežívajú (Blackhall et al., 1994).



Obrázok 1.: Reakcia protoplastov na fytohormóny v kultivačnom médiu. Upravené podľa Grafi (2004).

3.8. Výber rastlinného pletiva

Protoplasty je možné izolovať z rastlinného pletiva odobraného z rastlín v podmienkach *in vitro*, *ex vitro* ako aj kalusových kultúr. Kvôli odpadajúcej sterilizácii je veľmi výhodné použiť k izolácii aseptické - *in vitro* kultúry. V praxi sú najčastejším materiálom k izolácii používané mladé aktívne sa deliace pletivá bez chromozómových zmien a mutácií (Chawla, 2002).

Jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich výťažok protoplastov je zdrojové tkanivo a jeho vek. Protoplasty odvodené z rôznych tkanív si často ponechávajú svoje tkanivové, alebo bunkovo špecifické vlastnosti (Faraco et al., 2011). Ako sa líši vývoj tkanív druh od druhu neexistuje univerzálny vek pre odber donorového materiálu. Je dobré, vyhnúť sa mladým nevyzretým listom, ktoré vykazujú obmedzenú subcelulárnu diferenciáciu (Lung et al., 2011). Naopak, použitie starých listov a listov pokrytých voskovou vrstvou, prípadne vysoká koncentrácia sekundárnych metabolitov môže byť tiež príčinou znižovania výťažku protoplastov (Sutiojono et al., 1998).

Ďalším z hlavných faktorov úspešnej izolácie protoplastov je akumulácia škrobových zrn. Bolo preukázané, že zvyšujúca sa hladina škrobu bola spojená s nižšou životaschopnosťou protoplastov izolovaných z koreňov hrachu (Crowder et al., 1979). Podobné výsledky boli pozorované aj u iných druhov, kde škrobové zrná narušovali integritu protoplastov. K zníženiu hladiny škrobov je možné pred izoláciou vystaviť donorový rastlinný materiál 24 - 48 hodín temnu (Chang a Loescher, 1991).

3.9. Spôsoby izolácie protoplastov

3.9.1. Mechanická izolácia

Mechanickou izoláciou sú izolované protoplasty prevažne z buniek zásobných pletív ako napríklad pletivá druhu *Beta L.*, *Raphanus L.*, obsahujúce hlavne vakuolizované bunky.

Prvým krokom mechanickej izolácie je navodenie plazmolýzy buniek tak, aby nedošlo po odstránení bunkovej steny k ich popraskaniu. K tomu sú v praxi využívané hypertonické roztoky sacharidov (sacharózy, manitolu, sorbitolu) v koncentráciách 0,30-1,0 M v kombinácii s vápenatými iónmi (CaCl_2 ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) v koncentráciách od 0,25-0,40 M (Chawla, 2002). Princíp samotnej izolácie následne spočíva v narezaní pletiva v tomto hypertonickom roztoku, ak dôjde k zasiahnutiu priestoru medzi bunkovou stenou a protoplastom, dôjde k uvoľneniu nepoškodeného protoplastu.

Nevýhodou mechanickej izolácie je práve obmedzenie na typy pletív s vakuolizovanými bunkami, a hlavne veľmi malý počet získaných protoplastov. Zefektívnenie metódy izolácie priniesli až komerčne dostupné enzýmy húb rozkladajúcich bunkovú stenu ako celulózy, hemicelulózy a pektinázy. Pri enzymatickej izolácii môže dochádzať k poškodeniu protoplastov vznikom nežiadúcich metabolitov rozkladu a prevažne vplyvom oxidatívneho stresu. Vtedy je výhodnejšie použitie mechanickej metódy (Park et al., 2012).

3.9.2. Enzymatická izolácia

3.9.2.1. História enzymatickej izolácie

Prvú úspešnú enzymatickú izoláciu protoplastov uskutočnil Cocking (1960) za pomoci celulózy, získanú z huby *Myrothecium verrucaria* Alb. & Schwein. Podarilo sa mu vyizolovať protoplasty z koreňov rajčiaku *Solanum lycopersicum* L. vo veľkom množstve, čím sa enzymatická izolácia stala hlavnou metódou využívanou v praxi.

Spočiatku bola izolácia vykonávaná dvojstupňovou metódou, kde bol rastlinný materiál palisádového parenchýmu rozvoľnený pomocou pektinázy a po niekoľkých hodinách pôsobenia bol následne pridaný roztok celuláz (Takebe a Nagata, 1984). V roku 1968 bolo pokusmi overené, že je možné do enzymatickej zmesi pridať pektinázy a celulózy súčasne, tým proces výrazne urýchliť a eliminovať prípadné kontaminácie

(Power a Cocking, 1969). S vývojom aseptických metód izolácie a ich kultivácie sa v roku 1971 podarilo regenerovať rastlinu tabaku *Nicotiana tabacum* L. (Nagata a Takebe, 1971). V roku 1978 sa podarilo uskutočniť druhovú hybridizáciu medzi druhmi rajčiaku *Solanum lycopersicum* L. a zemiaku *Solanum tuberosum* L. (Melchers et al., 1978).

Metóda izolácie v jednom kroku

Pred maceráciou rastlinného materiálu v enzymatickom roztoku je materiál najprv mechanicky narušený. Enzymatický roztok pozostáva zo zmesi enzýmov (pektináza a celulóza) s optimalizovaným množstvom osmoticky aktívnych látok (Chawla, 2002).

Metóda je využívaná častejšie, vzhľadom na obmedzený počet krokov a tým znížené riziko kontaminácie, ako aj čas potrebný k izolácii (Blackhall et al., 1994).

Metoda izolácie v dvoch krokoch

Prvým krokom je rozvoľnenie strednej lamely pomocou pektinázy resp. macerozýmu.

Druhý krok pozostáva z prenesenia bunkovej suspenzie na roztok s prídavkom celulózy. V tomto roztoku zotrvávajú bunky kratšiu dobu (Chawla, 2002).

3.10. Postup enzymatickej izolácie

Zdrojový materiál pre enzymatickú izoláciu môže byť prakticky akékoľvek nezdvratené rastlinné pletivo. To však nezaručuje schopnosť delenia a následnej regenerácie na dospelé rastliny. V praxi sú s veľkou úspešnosťou využívané meristematické pletivá listov či pletivá embryonálne. Blackhall et al. (1994) pokusne dokázali vhodnosť mladých neúplne zreých pletív, ktoré vykazovali vyššiu schopnosť regenerácie v porovnaní s pletivami starými. Donorový materiál z *ex vitro* podmienok je najprv vysterilizovaný, v praxi obvykle prípravkami na báze chlórnanu sodného (NaClO), ktorého koncentrácia musí byť určená empiricky podľa stupňa kontaminácie a používaného rastlinného pletiva (Lung et al., 2015).

K lepšiemu prístupu enzýmov k mezofilovej vrstve buniek je niekedy epidermálna vrstva strhnutá mechanicky. Častejšie sú listy tkanív krájané na tenké prúžky o hrúbke asi 1 mm (Obrázok 2a; Obrázok 2b) (Blackhall et al., 1994; Davey et al., 2005). Hlavne u starších tkanív, prípadne tkanív druhov so silnou epidermálnou vrstvou môže byť k lepšej priestupnosti enzymatického média do mezofilových tkanív použitá izolácia

vo vákuu. V súčasnej dobe je vo väčšine izolačných protokolov používaná zmes enzýmov, 1-5 % celulózy a viac zložkovej zmesi enzýmov Macerozyme R-10, prípadne zmesi 0,05-1 % pektináz a 0,5-2 % hemiceluláz. Používaná koncentrácia týchto enzýmov sa líši v závislosti na rastlinnom druhu a používanom tkanive. Napríklad bunky hubovitého mezofylu *Arabidopsis* vyžadujú k rozvoľneniu nižšiu koncentráciu enzýmov ako radiálne usporiadané bunky mezofylu druhu *Lampranthus* L. (Lung et al., 2015).

Plazmolytické médium s koncentráciou vyššou ako koncentrácia bunkového protoplastu napomáha pri oddelení bunkovej steny a plazmalemy, čo uľahčuje jej enzymatickú degradáciu. Ako osmoticky aktívne látky sú v plazmolytickom médiu využívané sacharidy v koncentrácii 0,35-0,7 M a to mannitol, sorbitol, glukóza, sacharóza (Nagata a Takebe, 1971). Okrem koncentrácie enzýmov je rýchlosť uvoľňovania protoplastov ovplyvnená hodnotou pH roztoku. K jeho udržovaniu je používaný pufer, napríklad 2-(N-morfolín) ethansulfonová kyselina (MES). Macerozým a celulózy majú optimum v mierne kyslom prostredí pH 5-5,5, čo ale neodpovedá cytozolickému pH preto je najčastejšie volené optimum pH 5,7-7. Koncentrácia vápenatých a fosfátových iónov je v praxi upravovaná pridaním najčastejšie $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

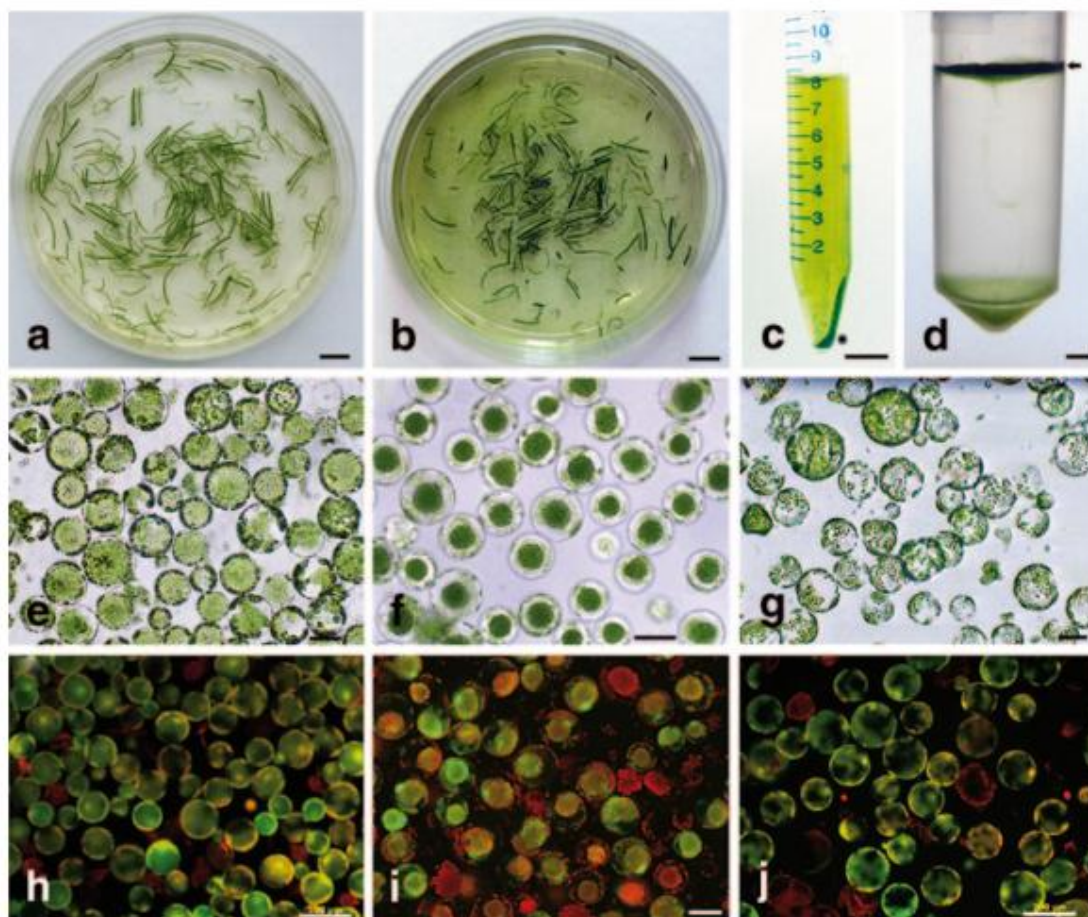
Pôsobenie enzymatickej zmesi najčastejšie prebieha na Petriho miskách utesnených parafilmom kvôli zamedzeniu vysychania roztoku. Často je suspenzia udržiavaná na trepačke, čo napomáha uvoľňovaniu protoplastov. Teplota inkubácie je volená ako kompromis optima rastlinného druhu a činnosti enzýmov najčastejšie okolo 30°C (Blackhall et al., 1994; Lung et al., 2015).

Po enzymatickej degradácii strednej lamely, k čomu je používaný macerozým, alebo pektináza, nasleduje rozvoľnenie bunkových stien celulózami (napr. Cellulysin, Onozuka R10). Takto získané protoplasty sa oddelia od nerozložených tkanív pomocou filtrácie cez nylonové, prípadne nerezové sitá s veľkosťou ok 20-200 μm (Park et al., 2012). K separácii mŕtvych a živých protoplastov je výsledná suspenzia centrifugovaná najčastejšie relatívnou silou centrifugácie od 50 x g po 300 x g najčastejšie po dobu 3-10 minút. Supernatant s pozostatkami mŕtvych protoplastov je odobratý Pasteurovou pipetou a na dne zostáva peleta čistých protoplastov (Obrázok 2c) (Park et al., 2012; Power a Cocking, 1969).

Ak je množstvo rastlinných zbytkov a mŕtvych buniek priveľké, je možné do procesu purifikácie začleniť čistenie pomocou flotácie, založenej na nižšej hustote

protoplastov v porovnaní s ostatnými časťami bunky. Metóda spočíva v nanesení hustotného gradientu najčastejšie v podobe roztoku sacharidov (sacharózy, sorbitolu) s koncentráciou 0,3-0,6 M na zmes enzýmov a bunkových zbytkov. Po centrifugácii dôjde k vyflotovaniu protoplastov k hornej vrstve - rozhraniu hustotných gradientov (Obrázok 2d). Prstenec protoplastov je odobraný Pasteurovou pipetou, rozpustený v premývanom médiu a sцентрифugovaný ako v predchádzajúcich krokoch (Blackhall et al., 1994; Lung et al., 2011).

Ako ekvivalent sacharózového hustotného gradientu je možné použiť vysokomolekulové látky ako sú Fricoll, Percoll, ktoré na rozdiel od sacharózy nepôsobia ako osmotiká, čím dochádza k získaniu väčšieho množstva viabilných protoplastov. Nevýhodou je potreba opakovaného premývania, s čím je spojené riziko poškodenia citlivejších protoplastov pri centrifugácii (Ochatt a Power, 1992). Súčasťou premývacích roztokov bývajú často vápenaté ióny (Ca^{2+}), stabilizujúce membrány protoplastov. Čisté protoplasty sa následne rozpustia v kultivačnom médiu o vhodnej hustote (Park et al., 2012).



Obrázok 2.: Postup izolácie protoplastov z listového mezofylu. **a** Časti listov v enzymatickom roztoku. **b** Časti listov po 3 hodinách v roztoku enzýmov. **c** Pelet protoplastov po centrifugácii. **d** Separácia živých protoplastov flotáciou sacharózovým gradientom. **e** Živé protoplasty *Arabidopsis* po izolácii. **f** Živé protoplasty *Bienertia sinuspersici* po izolácii. **g** Živé protoplasty *Kalanchoe daigremontiana* po izolácii; **h-j** Posúdenie viability pomocou farbenia fluoresceín diacetátom (FDA). **h** Protoplasty *Arabidopsis*. **i** Protoplasty *B. sinuspersici*. **j** Protoplasty *K. daigremontiana*. Florescencia FDA je znázornená zelenou, autofluorescencia chlorofylu červenou, prekryvajúci svetelný signál sa javí ako žltý. Mierka **a-c** = 1 cm, **d** = 2 mm, **e-j** 50 μ m. Prevzaté z Lung et al., (2015).

3.11. Agens zapojené do izolácie protoplastov

3.11.1. Donorový materiál

Protoplasty je možné vyizolovať z rastlinných tkanív (Raveh et al., 1973), kultúr kalusu (Chabane et al., 2007), bunkových suspenzií (Panis et al., 1993).

3.11.2. Overenie životaschopnosti protoplastov

K predbežnému zhodnoteniu viability vyizolovaných protoplastov môže byť použitý optický mikroskop. Zdravé protoplasty sú pozorované ako sférické objekty s rovnomerne rozloženými chloroplastami (Obrázok 2e, 2f, 2g), zatiaľ čo neviabilné protoplasty utvárajú zhluky chloroplastov a sú scvrknuté, prípadne popraskané vplyvom plazmoptýzy (Davey et al., 2005).

Presnejšie metódy stanovovania sú založené na meraní fotosyntetickej aktivity, pozorovaní prúdenia cytoplazmy, farbení rôznymi reakčnými zmesami. V praxi sú protoplasty najčastejšie farbené pomocou fluorescín diacetátu (FDA) (Obrázok 2h, 2i, 2j), fenosafranínu, methylénovej modrej alebo Evansovej modrej (Lung et al., 2015).

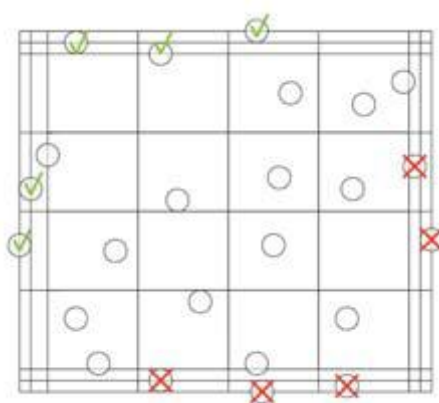
Fluorescín diacetátová metóda je založená na prestupnosti FDA plazmatickou membránou protoplastov. V cytozole je štiepená esterázami a dochádza k uvoľňovaniu fluoresceínu. Ten je po ožiarení UV svetlom detegovaný ako zelenožltá fluorescencia, ktorú vykazujú len protoplasty s nepoškodenou plazmatickou stenou, po dobu asi piatich minút. Roztok FDA je pripravovaný zmiešaním cca 100 μ l suspenzie protoplastov v čistiacom eventuálne v kultivačnom médiu a rovnakého množstva média s fluoresceín diacetátom (0,1 ml roztoku FDA s koncentráciou 5 mg.ml⁻¹ rozpustený v 10 ml média) (Bhojwani a Razdan, 1996). Ostatné metódy mikroskopickej detekcie viability sú založené na neprestupnosti farbív nepoškodenou plazmatickou membránou protoplastu (Kanai a Edwards, 1973; Evans a Bravo, 1983). Životaschopnosť protoplastov je potom vyjadrená ako pomer živých a mŕtvych protoplastov.

3.11.3. Posúdenie výnosu izolácie protoplastov

K najjednoduchším a v praxi najčastejšie používaným metódam stanovenia výťažku vyizolovaných protoplastov patrí metóda použitia Hemocytometru (Bürkerovej komôrky).

Komôrka pozostáva z dvoch oddelených počítacích polí. Každé rozdelené na 9 polí ohraničené trojitou čiarou ohraničujúce štvorec (1 x 1 mm = 1 mm²) Centrálna polia sú ďalej delené na štvorčeky (0,25 x 0,25 mm). Vyvýšené okraje hemocytometru držia krycie sklíčko a vymedzujú tak objem komôrky.

Zarátavané sú len protoplasty dotýkajúce sa dvoch zvolených hrán trojčiar (z vonkajšej aj vnútornej strany), protoplasty dotýkajúce sa zvyšných dvoch strán sú ignorované (Obrázok 3). Priemerný počet protoplastov vo štvorci sa použije k výpočtu koncentrácie protoplastov (Cell Types and Culture Characteristics, 2010).



Obrázok 3.: Počítanie protoplastov. Upravené z Cell Types and Culture Characteristics (2010).

3.11.4. Kultivácia protoplastov a ich nároky na živiny

Pre obnovu bunkovej steny, tvorbu kalusu a následnú organogézu musia byť protoplasty prenesené na kultivačné médium.

Protoplasty môžu byť kultivované v kvapalnom alebo pevnom médiu. Kvôli jednoduchšej kontrole osmotických podmienok a manipulácii sú v prvých fázach, vytvorenia bunkovej steny, delenia buniek, a vzniku mikrokalusov uprednostňované tekuté médiá. Vzniknuté kalusy sú následne prenášané na médiá pevné. Ekvivalentom tekutých medií je obalovanie protoplastov v algináte prípadne agarozových blokoch (Chawla, 2002).

Súčasťou kultivačných medií sú rovnaké komponenty ako pri použití kalusových alebo suspenzných kultúr. Teda mikro a makro prvky, zdroje uhlíka, vitamíny, antioxidanty a fytohormóny. Podstatným rozdielom je zahrnutie osmotických činidiel v koncentrácii ako pri ich izolácii, čo nahrádza bunkovú stenu odstránenú enzymatickým rozkladom, a tým zamedzuje deštrukcii protoplastov (Shepard a Totten, 1975). Ako už bolo spomínané, požadovanú hodnotu osmotického potenciálu je možné dosiahnuť pridaním manitolu, sorbitolu, glukózy, alebo sacharózy. Je dokázané, že obsah železa,

zinku a amónnych iónov v bežne používaných tkanivových kultúrach môže byť pre kultúry protoplastov príliš vysoký. Mezofilové protoplasty druhu *Pisum* L. najlepšie prosperovali pri koncentrácii 5 μM Fe a 10 μM Zn (Crowder et al., 1979). Naopak vyššia koncentrácia vápnika v kultivačných médiách zvyšuje integritu bunkových membrán a tak zvyšuje toleranciu k oxidatívne stresu. V praxi je používaná koncentrácia 2-4 krát vyššia, ako v bežných médiách tkanivových kultúr, obvykle 10-14 mmol.l^{-1} (Lung et al., 2015). Bolo zistené, že vyššie koncentrácie vápnika redukujú zhukovanie protoplastov a ich hnednutie (Veilleux et al., 2005). V pokusoch Uchimiya a Murashige (1976) dokázali, že protoplasty tabakových kultúr vyžadovali omnoho menšie hladiny sacharidov, ako ich kalusové kultúry. Protoplasty *Arabidopsis thaliana* L. najrýchlejšie regenerovali bunkovú stenu s 1,5 % koncentraciou sacharidov v médiu (O'Neill a Mathias, 1993). V praxi sú bežne používané koncentrácie osmotík 0,3-0,7 mol.l^{-1} . Koncentrácie osmotík sú postupne eliminované po nasynetizovaní bunkových stien a prenesení na tuhé média (Veilleux et al., 2005).

Požiadavky vitamínov (thiamín, myoinositol, kyselina nikotínová, pyridoxín) v živných médiách bývajú zvyčajne rovnaké, ako v štandardných tkanivových kultúrach. Spolu s ostatnými zložkami médií napomáhajú syntéze bunkových stien a ich následnému deleniu. Ako zdroj dusíka ihneď prístupný pre kultúry protoplastov je používaný hydrolyzát kazeínu (Blackhall et al., 1994).

Pre tvorbu bunkovej steny ako aj pre následné delenie buniek sú nevyhnutnosťou kultivačných médií prídavky auxínov a cytokinínov. Väčšina používaných médií obsahuje súčasne auxíny a cytokiníny v rôznych pomeroch, ktoré sú volené podľa rastlinného druhu a typu donorového pletiva. Ich koncentrácie v roztoku musia byť zistené empiricky. Medzi bežne používané auxíny patrí 2,4-D, NAA, IAA. Bolo zistené, že 2,4-D môže pozitívne pôsobiť pri resyntéze bunkovej steny, ale použitie samotného auxínu viedlo u druhu *Arabidopsis thaliana* L. k strate morfológického potenciálu a rozvoja kalusov (O'Neill a Mathias, 1993). Medzi bežne používané cytokiníny patrí BA, Zeatin, Thidiazuron. Bolo zistené, že Zeatin zvyšuje delenie buniek a morfológický potenciál rozvíjajúcich sa kalusov (Pongchawee et al., 2006).

Po vytvorení bunkovej steny dochádza k výraznému nárastu buniek a k prvému deleniu dochádza počas 3-5 dní. Po štrnástich dňoch sú väčšinou viditeľné malé zhuky buniek - mikrokalusy. Kalusy o veľkosti 1 mm sú v kultúre viditeľné po cca 6 týždňoch

kultivácie. Ak tieto kolónie aj naďalej zotrúvajú na vysoko osmotických médiách, býva ich rast inhibovaný, preto musia byť koncentrácie osmotík upravené (Blackhall et al., 1994; Lung et al., 2015).

V prvých dňoch po izolácii sú všeobecne kultúry protoplastov udržiavané bez prístupu svetla. Nagata a Takebe (1971) dokázali, že rast protoplastov tabaku bol v počiatočných fázach kultivácie vysokou intenzitou osvetlenia inhibovaný. Po 48 hodinách, kedy dochádza u väčšiny druhov k nasyntetizovaniu bunkovej steny, bývajú protoplasty vystavené osvetleniu s intenzitou 1500-3000 lux. Teplota behom kultivácie je regulovaná na 25-28 °C (Chawla, 2002).

3.11.5. Koncentrácia protoplastov v kultivačných médiách

Hustota protoplastov v kultivačných médiách má zásadný vplyv na tvorbu bunkovej steny a následnú tvorbu mikrokalusov. Protoplasty sú najčastejšie kultivované v hustotách 104 000-105 000 protoplastov.ml⁻¹. V skorých štádiách kultivácie majú protoplasty kultivované pri vyšších hustotách tendenciu k spontánnej fúzii, a tým k tvorbe nežiadúcich hybridných tkanív (Blackhall et al., 1994; Chawla, 2002; Lung et al., 2015).

3.12. Typy kultivačných médií

Kultivačné médiá protoplastových kultúr je možné deliť na základe ich chemického zloženia a ich fyzikálnych vlastností. Existuje mnoho typov kultivačných médií líšiacich sa náročnosťou jednotlivých druhov na živiny a osmotické podmienky. V praxi sú najčastejšie používané médiá MS, B5 (Kao a Michayluk, 1975). Na základe fyzikálnych vlastností sa médiá delia na kvapalné a pevné (Lung et al., 2015).

3.12.1. Tekuté médiá

Kvapalné médiá, sú médiá v ktorých protoplasty voľne plávajú.

1. Protoplasty môžu byť inkubované v tenkej vrstve média najčastejšie na Petriho miske. Miska by mala byť utesnená parafilmom kvôli vysychaniu a prípadnej kontaminácii a umiestnená v regulovaných svetelných a teplotných podmienkach.
2. Protoplasty môžu byť inkubované v kvapkách média na uzatvorenej Petriho miske umiestnenej v regulovaných svetelných a teplotných podmienkach.

3. Protoplasty môžu byť inkubované v 50-100 ml Erlenmayerovej banke obsahujúcej cca 5 ml kultivačného média umiestnenej v regulovaných svetelných a teplotných podmienkach (Lung et al., 2015).

3.12.2. Pevné médiá

3.12.2.1. Agarózové médiá

Metódu obal'ovania protoplastov v agarózovom médiu popísal prvýkrát Gamborg et al. (1975), jedná sa o najčastejšie používanú metódu kultivácie protoplastov na pevnom médiu.

1. Za stáleho miešania je do roztoku kultivačného média s 1-2 % agaru pridaný rovnaký objem roztoku izolovaných protoplastov o hustote 105 tis. buniek.ml⁻¹ rozpustených v rovnakom kultivačnom médiu. Je potrebné venovať zvýšenú pozornosť, aby teplota agarózového kultivačného média nepresiahla 45°C. Po zatuhnutí agaru je miska utesená parafilmom, kvôli vysúšaniu. Misky sú kultivované v obrátenej polohe pri riadených teplotných a svetelných podmienkach.
2. Agarózový blok protoplastov pripravený podľa metódy č. 1. je rozkrájaný na kúsky veľkosti zhruba 1 cm². Zopár kúskov je vložených do suspenznej kultúry buniek s rovnakou koncentráciou ako je koncentrácia protoplastov zaliatych v agarózovom médiu. Aktívne sa deliaca suspenzná kultúra buniek podporuje tvorbu bunkovej steny a delenie u protoplastov (Raveh et al., 1973). Význam podpornej bunkovej suspenzie bol popísaný u celej rady rastlinných druhov. Kyozyuka et al. (1987) s úspechom použili aktívne rastúce bunky ryže na stimuláciu protoplastov z rovnakého donorového materiálu. Jain et al. (1995) získali štyrikrát väčšie množstvo aktívne rastúcich protoplastov dvoch indických druhov ryže za použitia suspenznej kultúry druhu *Oryza ridleyi* Hook. f., alebo *Lolium multiflorum* Lam.

3.12.2.2. Alginátové médiá

Kyselina alginová, alginát, je rastlinný polysacharid rôznych druhov hnedých rias, ktorý sa vyskytuje hlavne u druhov napr. *Laminaria*. Tento polymér tvoria molekuly kyseliny β-D-manuronovej a α-L-guluronovej vyskytujúce sa v homopolymérnych blokoch s vloženými blokmi oboch monomérov. K zgelovateniu, tuhnutiu sodných alginátov dochádza pri styku s dvojmocnými, alebo viacmocnými kationmi (Smidsrod, 1972). V praxi sú najčastejšie používané ióny vápnika Ca²⁺.

Alginát 1,75-4% (w/v) je pridaný do vhodného kultivačného média s nízkym obsahom vápnika (2mM) a vhodnou koncentráciou osmotík. Po úplnom rozpustení je roztok sterilizovaný autoklávaním, alebo pomocou 45 μ m filtra. Alginátový roztok izbovej teploty je zmiešaný s protoplastmi o vhodnej hustote, bežne $1 \cdot 10^5$. Suspenzia alginát-protoplasty je po kvapkách pridávaná do roztoku CaCl₂ a osmotík o vhodnej koncentrácii. Vzniknuté guľôčky sú ponechané v roztoku CaCl₂ 45-60 minút, do úplného zatuhnutia. Následne je roztok CaCl₂ nahradený vhodným kultivačným médiom (Lei et al., 2014).

Pre spomalenie tuhnutia (uvoľňovania vápnikových iónov do roztoku), môže byť CaCl₂ v roztokoch nahradený napríklad CoSO₄ s malým množstvom komplexotvorných činidiel ako sú fosfáty (Draget et al., 1989).

Výhodou alginátových médií je jednoduchá manipulácia s kultúrami. Vysoká afinita alginátu sodného k rastlinným protoplastom zaručuje zachovanie dobrej integrity protoplastov hlavne v raných štádiách kultivácie, pred nasyntetizovaním bunkových stien. (Larkin et al., 1988).

4. Materiál a metódy

4.1. Biologický materiál

Donorový rastlinný materiál *ex vitro* kultúr poskytnutý Katedrou zahradníctví Českej zemědělskej univerzity bol pestovaný v stolovom sklenníku pri regulovanej teplote $25^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$. Listy vybraných kultivarov (Zoznam použitých kultivarov *ex vitro*, str. 29) staré 2-4 dni boli používané k izolácii.

In vitro kultúry kultivaru *P. paniculata* var. *alba*, "Mount Fuji" boli kultivované v sklenených nádobách o objeme 150 ml na cca 25 ml MS média (Duchefa) (Murashige a Skoog, 1962) s prídavkom 30 g sacharózy, bez použitia fytohormónov, pH média bolo upravené pomocou roztoku KOH, alebo roztoku kyseliny askorbovej na hodnotu 5,7. Kultúry boli udržiavané v kultivačných boxoch s fotoperiódou 16 hodín svetla a teplotou 25°C a 8 hodín tmy pri teplote 18°C . K izolácii protoplastov boli použité listy 35-45 dní starých kultúr.

Protoplasty boli izolované len zo zdravých, svetlo-zelených listov. V prípade *ex vitro* kultúr veku približne 2-4 dní starých listov. Tie boli rozdelené na listy vrcholového meristému, prvý pár listov od vrcholového meristému, a druhý pár listov od vrcholového meristému.

4.2. Sterilizácia biologického materiálu

Čepele listov z *ex vitro* kultúr boli sterilizované ponorením do 1% roztoku chlornanu sodného s prídavkom zmáčadla Tween po dobu 10 minút. Takto vysterilizované listy boli trikrát premyté sterilnou destilovanou vodou.

4.3. Metódy izolácie protoplastov

4.3.1. Metóda izolácie podľa Cheng a Saunders (1995)

V prvom kroku bol jeden pár listov z *ex vitro* kultúr, alebo 5-6 párov listov z *in vitro* kultúr nakrájaných na približne 1 mm široké pásiky v Petriho miske s priemerom 90 mm v 12 ml roztoku 0,3 M sorbitolu a 0,05 M CaCl_2 vysterilizovaného autoklávaním.

V tomto osmotickom médiu boli časti listových čepelí inkubované hodinu pri teplote 23°C bez prístupu svetla, Petriho miska bola proti vysychaniu média utesnená parafilmom.

Po hodine bol roztok nahradený digesčným médiom B (Tabuľka 1), s obsahom 0,5 % celulázy R-10 (Serva) a 0,1 % macerozýmu R-10 (Serva). Roztok bol sterilizovaný pomocou membránového filtra s veľkosťou pórov 0,22 μm . Suspenzia digesčného média B a častí listov bola kultivovaná v utesnenej Petriho miske na trepačke pri 40 rpm 16-20 hodín.

Roztok uvoľnených protoplastov a zvyškov nerozložených častí listových čepelí bol opatrne prefiltrovaný cez sterilné nylonové sito s veľkosťou pórov 220 μm a rovnomerne rozdelený do dvoch sterilných 15ml centrifugačných skúmaviek. Zvyšky listov boli následne prepláchnuté 0,3 M roztokom KCl sterilizovaného pomocou autoklávy, vzniknutá suspenzia bola rovnomerne pridaná do centrifugačných skúmaviek obsahujúcich roztok digesčného média B a protoplastov. Skúmavky boli následne centrifugované silou 71 x g po dobu piatich minút a teplote 20°C (Hettich 30 RF).

Po centrifugácii bol supernatant odstránený Pasteurovou pipetou a vzniknutá peleta živých a mŕtvych protoplastov pomaly zmiešaná v novej centrifugačnej skúmavke s 10 ml roztoku 20% sacharózy sterilizovanom pomocou membránového filtra s veľkosťou pórov 0,22 μm . K vytvoreniu hustotného gradientu bol na povrch tejto suspenzie Pasteurovou pipetou opatrne nanesený 1-2 ml 0,3 M roztoku KCl. Skúmavky boli následne centrifugované silou 61 x g po dobu desiatich minút a teplote 20°C (Hettich 30 RF). Vitálne protoplasty z rozhrania roztokov boli odobrané pomocou Pasteurovej pipety a rozpustené v 10 ml 0,3 M roztoku KCl. Skúmavky boli následne centrifugované silou 50 x g po dobu piatich minút a teplote 20°C (Hettich 30 RF).

Vzniknutá peleta viabilných protoplastov bola rozpustená v 10 ml média C (Tabuľka 1). Následne bola zistená koncentrácia a viabilita protoplastov, metódou popísanou v nasledujúcej kapitole.

Tabuľka 1.: Zloženie roztokov média Cheng a Sounders. Upravené podľa Cheng a Sounders (1995).

Zloženie		Médium	
		B	C
Mikro a makroprvky (mg.l⁻¹)	KNO ₃	950	1900
	KH ₂ PO ₄	85	170
	MgSO ₄ .7H ₂ O	185	370
	CaCl ₂ .2H ₂ O	660	1320
	Na ₂ EDTA	18,65	37,3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	27,8
	MnSO ₄ .4H ₂ O	11,5	22,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,3	10,6
	H ₃ BO ₃	3,1	6,2
	KI	0,415	0,83
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,125	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,013	0,026
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,013	0,026
Aminokyseliny, vitamíny	Thiamín	10	20
	Kys. Nikotinová	0,5	1
	Pyridoxín	0,5	1
	Myoinositol	100	200
	Kaseín		500
	Glycín	2	4
	Glutamín		200
Sacharidy (g.l⁻¹)	Sacharóza		10
	Glukóza	18	30
	Mannitol	73	
	Sorbitol		4,5
Ostatné zložky (g.l⁻¹)	MES	1	
	PVP-10	5	
pH		5,7	5,7

4.3.2. Zrýchlená metóda izolácie

Zrýchlená metóda izolácie pozostávala z enzymatického uvoľnenia protoplastov, ktorému nepredchádzal proces macerácie v plazmolytickom roztoku a proces purifikácie prebiehal len v jednom kroku.

Jeden pár listov z *ex vitro* kultúr, alebo 5-6 párov listov z *in vitro* kultúr boli v sterilnom prostredí flow-boxu nakrájané na približne 1 mm široké časti v 12 ml digesčného média P1, P2 alebo P3 s prídavkom Cellulase z *Trichoderma reesei* (Sigma) v 1 % koncentrácii a Pectinase z *Aspergillus aculeatus* (Sigma) v koncentrácii 1,5 %. Tento roztok bol sterilizovaný pomocou membránového filtra s veľkosťou pórov 0,22 μm , pH roztoku bolo upravené na hodnotu 5,7. Proces enzymatického uvoľnenia protoplastov prebiehal v utesnenej Petriho miske, na trepačke pri 40 rpm 4-5 hodín, urýchlenie degradácie bunkových stien bolo podporené zvýšenou teplotou 30°C.

Následne bola zmes protoplastov a digesčného média prefiltrovaná pomocou nylónového sita s veľkosťou pórov 220 μm do centrifugačných skúmaviek. Tie boli centrifugované silou 71 x g po dobu piatich minút pri teplote 20°C (Hettich 30 RF). Supernatant bol odstránený Pasteurovou pipetou a peleta živých a mŕtvych protoplastov resuspendovaná v 10 ml média C. Následne bola zistená koncentrácia a viabilita protoplastov.

4.4. Stanovenie výťažku protoplastov

Počet protoplastov bol počítaný pomocou Bürkerovej komôrky umiestnenej na svetelnom mikroskope (Olympus CKX41) z počiatkovej suspenzie protoplastov v médiu C. Zo šiestich štvorcových polí Bürkerovej komôrky (1 x 1 mm) bol vypočítaný aritmetický priemer, podľa ktorého bola vypočítaná koncentrácia protoplastov v 1 ml suspenzie. Suspenzia protoplastov bola nariadená roztokom C na koncentráciu 115 ± 10 tis. buniek. ml^{-1} . Stanovenie koncentrácie pomocou Bürkerovej komôrky je bližšie popísané v kapitole 3.11.3.

4.5. Stanovenie viability protoplastov

Viabilita protoplastov bola zistená farbením 0,47 M roztokom manitolu s prídavkom 0,25% metylénovej modrej a následným spočítaním v Bürkerovej komôrke.

Dva diely suspenzie protoplastov s koncentráciou 115 tis. buniek.ml⁻¹ boli zmiešané s jedným dielom roztoku methylenovej modrej. Počet viabilných protoplastov bol potom vyjadrený ako pomer živých a mŕtvych protoplastov.

4.6. Kultivácia protoplastov

Ako východzí materiál pri zavádzaní na tekuté a pevné médiá bola používaná suspenzia protoplastov s koncentráciou približne 115±10 tisíc.ml⁻¹ v roztoku média C.

Médiá s prídavkom fytohormónov (B1 ~ B6; C1 ~ C6 T1 ~ T6) (Tabuľka 2). pozostávali z kultivačného média C a prídavku požadovaných fytohormónov v dvojnásobnej koncentrácii, ako bola požadovaná koncentrácia vo výslednej suspenzii protoplastov. Všetky kultivačné médiá boli sterilizované autoklávaním 15 min pri 121°C a tlaku 1,2 kg.cm⁻¹.

Protoplastové kultúry boli kultivované pri izbovej teplote bez prístupu svetla. Kontrola stavu kultúr prebiehala pomocou optického mikroskopu Olympus CKX41 na 2. 3. a 6. ± 1 deň od izolácie protoplastov.

Tabuľka 2.: Koncentrácia fytohormónov v kultivačných médiách.

Fytohormón		Médium					
		B1	B2	B3	B4	B5	B6
		(mg.l ⁻¹)					
Auxín	IAA	-	0,5	1	2	3	6
Cytokinín	BA	3	3	3	3	3	3
Médium	Označenie	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Auxín	IAA	-	0,5	1	2	3	6
Cytokinín	Kinetín	3	3	3	3	3	3
Médium	Označenie	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Auxín	IAA	-	0,5	1	2	3	6
Cytokinín	TDZ	3	3	3	3	3	3

4.6.1. Kultivácia na tekutých médiách

Do Petriho misiek s priemerom 40 mm bolo napipetované v sterilnom prostredí flow-boxu 1000 μ l požadovaného kultivačného média s fytohormónmi (B1 ~ B6; C1 ~ C6 T1 ~ T6). Do týchto kultivačných médií bolo prenesené 1000 μ l suspenzie protoplastov v kultivačnom médiu C, po zmiešaní tak roztoky obsahovali požadovanú koncentráciu fytohormónov.

4.6.2. Kultivácia na alginátových médiách

Roztok 2 ml alginátového média A (Tabuľka 3). sterilizovaného autoklávaním bol Pasteurovou pipetou zmiešaný s 2 ml suspenzie protoplastov. Vzniknutá suspenzia gélu a protoplastov bola po kvapkách pridávaná do 40mm Petriho misiek obsahujúcich 8 ml zrážacieho roztoku Z (Tabuľka 3), po uplynutí 45 minút bol roztok Z nahradený kultivačným médiom C s prídavkom fytohormónov. Petriho misky boli uzavreté parafilmom a kultivované pri izbovej teplote bez prístupu svetla. Metóda prípravy alginátových médií je detailnejšie popísaná v kapitole 3.12.2.2. Alginátové médiá.

Tabuľka 3.: Zloženie roztokov alginátového média.

Zloženie		Médium	
		A	Z
Mikro a makroprvky (mg.l ⁻¹)	KNO ₃	1900	
	KH ₂ PO ₄	170	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1320	7350
	Na ₂ EDTA	37,3	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6	
	H ₃ BO ₃	6,2	
	KI	0,83	
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,026	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,026	
	Aminokyseliny, vitamíny	Thiamín	20
Kys. Nikotinová		1	
Pyridoxín		1	
Myoinositol		200	
Kazeín		500	
Glycín		4	
Glutamín		200	
Sacharidy (g.l ⁻¹)	Sacharóza	10	
	Glukóza	30	
	Mannitol		82
	Sorbitol	4,5	
Ostatné zložky (g.l ⁻¹)	Alginát sodný	3,4	
Fytohormóny (mg.l ⁻¹)	IAA	4	
	TDZ	1	
pH		5,7	5,7

Zoznam použitých kultivarov *ex vitro*:

- *Phlox paniculata* “Dracon“
- *Phlox paniculata* “MT1“
- *Phlox paniculata* “P1“
- *Phlox paniculata* “Starfire“

4.6.3. **Vyhodnotenie výsledkov pokusov**

4.6.3.1. **Štatistické vyhodnotenie**

Priemerné výťažky protoplastov boli spracované metódou analýzy rozptylu pomocou softwaru STATISTICA CZ (verzia 12) z dvoch opakovaní pre zistenie vplyvu veku donorového materiálu v procese izolácie, zo štyroch opakovaní pre porovnanie výťažku protoplastov vzhľadom na typ použitého enzýmu a dvoch opakovaní pre zistenie vplyvu antioxidantov v digesčnom médiu.

4.6.3.2. **Hodnotenie vplyvu kultivačných médií**

Testovanie vplyvu fytohormónov nebolo náplňou tejto diplomovej práce, bolo ale návazným krokom overenia ich životaschopnosti, preto sa v práci nezaobrám štatistickým zhodnotením vplyvu kultivačných médií (Tabuľka 2).

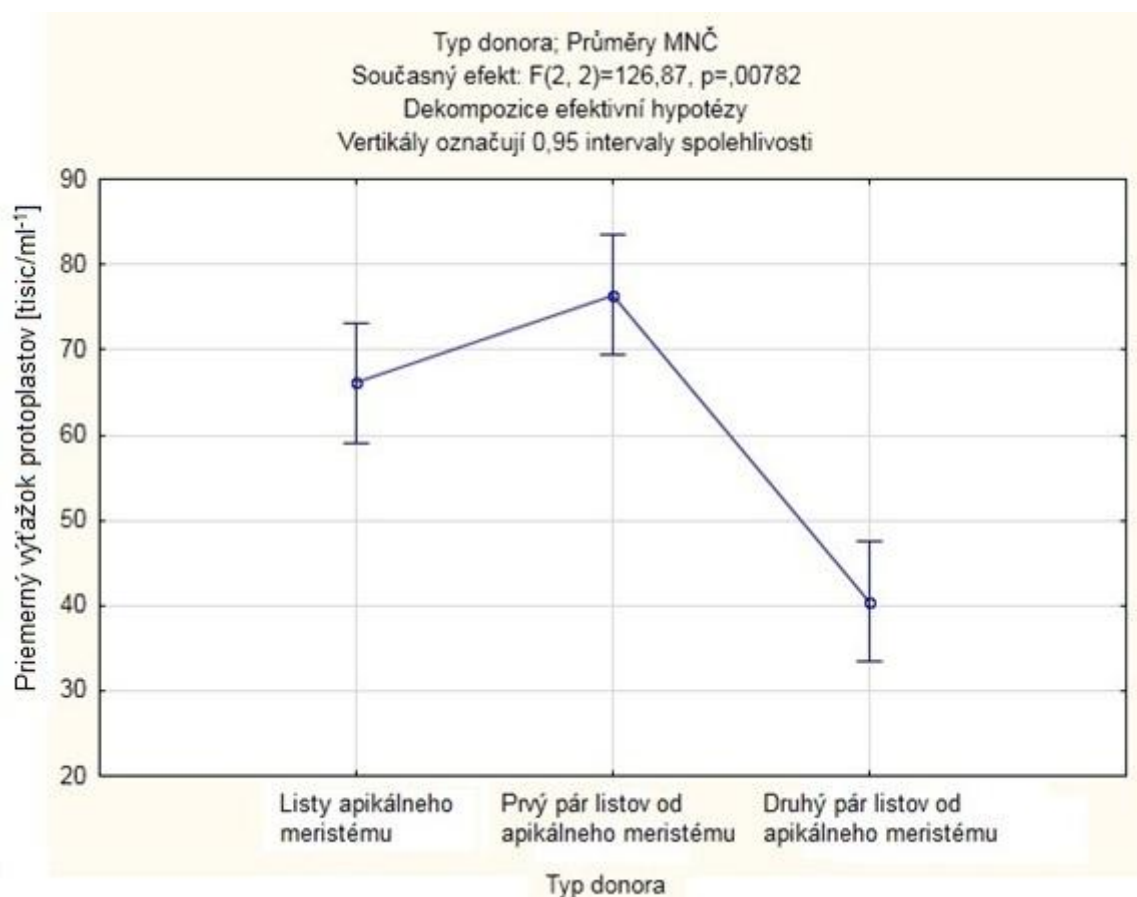
Zhodnotenie vplyvu kultivačných médií pozostávalo z pravidelného pozorovania pomocou optického mikroskopu, pričom boli pozorované morfológické zmeny vývoja protoplastových kultúr, ktoré boli fotograficky zaznamenávané.

5. Výsledky

5.1. Vplyv veku donorového materiálu na izoláciu protoplastov

Bol testovaný vplyv veku donorového materiálu na celkový výťažok, v procese izolácie. Štatistické zhodnotenie preukázalo signifikantný rozdiel na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ a to v počte vyizolovaných protoplastov z listov apikálneho meristému ($66,11 \pm 11,01 \cdot 10^4$ protoplastov.ml⁻¹) a listov prvého páru ($74,43 \pm 13,07 \cdot 10^4$ protoplastov.ml⁻¹) v porovnaní s druhým párom listov od apikálneho meristému ($40,49 \pm 10,91 \cdot 10^4$ protoplastov.ml⁻¹) (Obrázok 4; Tabuľka 4). Medzi testovanými typmi donorového materiálu v procese izolácie sa ako najlepšie ukázalo použiť prvý pár listov od vrcholového meristému (Obrázok 5a). Po purifikácii mali protoplasty izolované z prvého páru listov od apikálneho meristému sférický tvar, a pravidelne rozložené chloroplasty, čo naznačuje ich vysoký stupeň viability. Priemerný počet vyizolovaných protoplastov v prípade použitia tekutých enzýmov bol v 1 ml média $85,14 \pm 16,9 \cdot 10^4$ čo signifikantne potvrdila štatistická analýza na hladine významnosti $\alpha=0,05$ (Obrázok 6), z tejto hodnoty tvorili priemerne 56% protoplasty viabilné. Z čepelí listov druhého páru od vrcholového meristému bol vyizolovaný priemerne menší počet protoplastov porovnateľnej viability ako mali protoplasty izolované z prvého páru listov od vrcholového meristému. Ako nevhodné sa ukázalo použitie najmladších listov vrcholového meristému, ktorých výťažky možno zrovnávať s prvým párom listov, ich viabilita sa ale po izolácii pohybovala priemerne len okolo 12 % v prípade použitia tekutých enzýmov (Obrázok 5b).

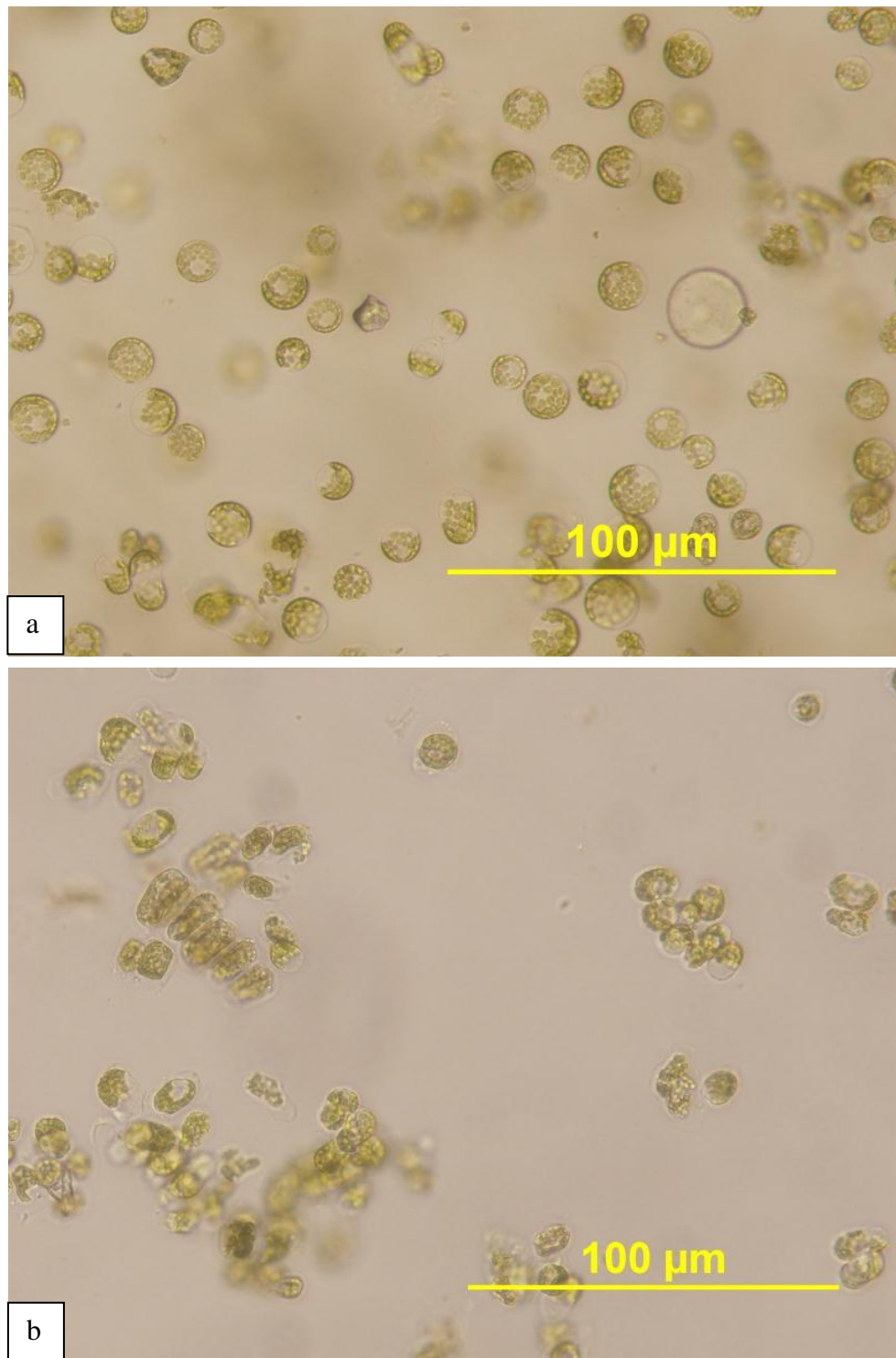
Donorový materiál kultúr *in vitro* bol odoberaný po 35-45 dňoch kultivácie. Na jednu Petriho miskú s 12 ml enzymatického roztoku bolo použité priemerne 6-8 párov vrchných listov prvého, druhého a tretieho páru od apikálneho meristému vrátane listov vrcholového meristému. Priemerný počet vyizolovaných protoplastov bol v 1 ml média 58,65 tisíc. Vzhľadom na kvantitu a kvalitu izolovaných protoplastov sa ukázalo použitie donorového materiálu z *in vitro* kultúr ako vhodná alternatíva namiesto kultúr *ex vitro*.



Obrázok 4.: Priemerný počet vyizolovaných protoplastov podľa veku donorového materiálu. Priemerné počty vyizolovaných protoplastov \pm smerodatná odchýlka. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabuľka 4.: Zloženie digesčných médií s antioxidantmi.

Zloženie	P1	P2	P3
	(g.l ⁻¹)		
CaCl₂.2H₂O	15	15	15
Mannitol	82	82	82
MES	1	1	1
PVP-10	5	10	15
Cellulase (% , v/v)	1	1	1
Pectinase (% , v/v)	1,5	1,5	1,5



Obrázok 5.: Vplyv veku donorového materiálu pri izolácii. **a** Protoplasty po purifikácii izolované z čepelí listov prvého páru pomocou tekutých enzýmov. **b** Protoplasty po purifikácii izolované z čepelí listov vrcholového meristému pomocou tekutých enzýmov.

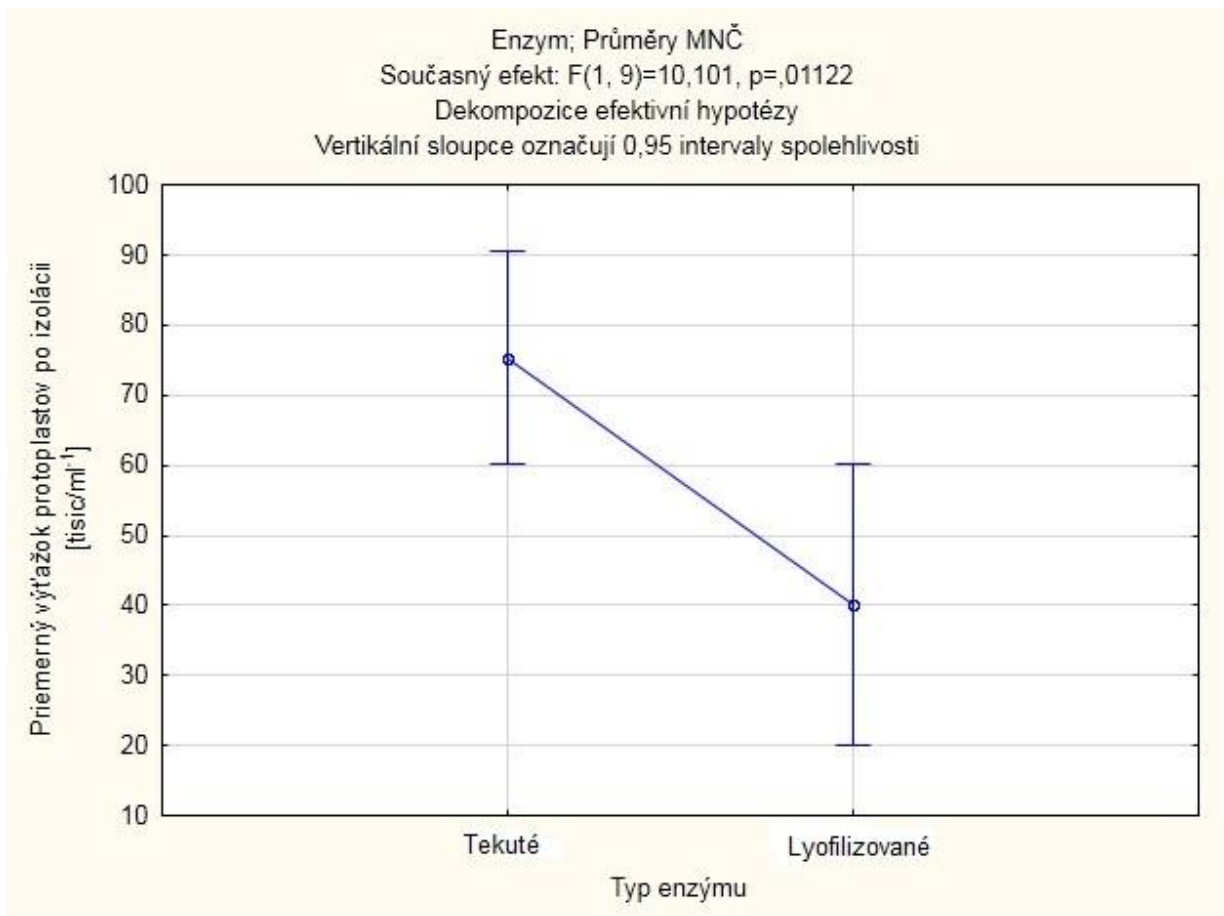
5.2. Porovnanie výťažku protoplastov vzhľadom na použité enzýmy

V pokusoch boli v procese izolácie protoplastov použité dva druhy enzýmov. Lyofilizované enzýmy, celulóza Onozuka R-10 z *Trichoderma viride* Pers. (Serva) v koncentrácii 0,5 % (w/v) v kombinácii s macerozýmom R-10 z *Rhizopus* sp. (Serva) v koncentrácii 0,1 % (w/v), a enzýmy tekuté, Cellulase z *Trichoderma reesei* (Sigma) v 1 % (v/v) koncentrácii a Pectinase z *Aspergillus aculeatus* (Sigma) v koncentrácii 1,5 % (v/v).

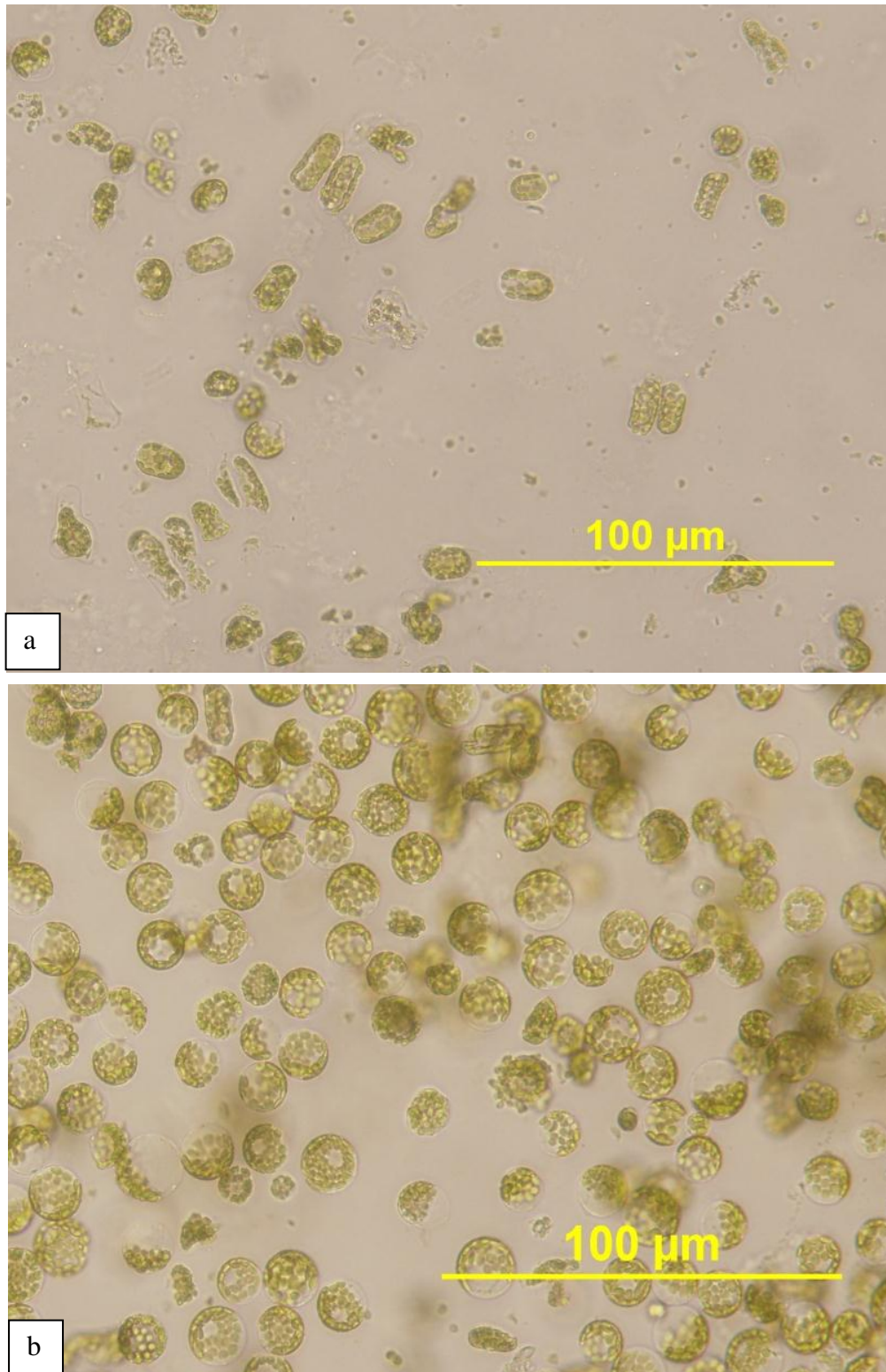
Štatistické zhodnotenie preukázalo signifikantný rozdiel v počte vyizolovaných protoplastov vzhľadom na typ použitého enzýmu. Priemerný výťažok protoplastov pri použití lyofilizovaných enzýmov bol $36,88 \pm 16,71 \cdot 10^4$ protoplastov.ml⁻¹, pri použití tekutých enzýmov činil výťažok $85,14 \pm 16,9 \cdot 10^4$ protoplastov.ml⁻¹ ($\alpha = 0,05$).

Použitie lyofilizovaných enzýmov malo za následok získanie priemerne o 43,3 % menšieho počtu vyizolovaných protoplastov v porovnaní s enzýmami tekutými. V prípade použitia vyzretejšieho donorového materiálu boli bunkové steny často nerozložené (Obrázok 7). Priemerný počet vyizolovaných protoplastov bol v 1 ml enzymatického roztoku v prípade kultúr *ex vitro* 39,91 tisíc v prípade donorového materiálu z *in vitro* kultúr 58,65 tisíc protoplastov.

Výťažok protoplastov izolovaných z listov kultúr *ex vitro* tekutými enzýmami sa v priemere pohyboval 85,16 tisíc v 1 ml roztoku, v prípade donorového materiálu z *in vitro* kultúr 58,65 tis.ml⁻¹. Ich bunkové steny boli takmer v 100 % prípadov rozložené, a to aj v prípade ak sa jednalo o vyzretejšie čepele listov.



Obrázok 6.: Výťažok protoplastov vzhľadom na typ použitého enzymu. Priemerné počty vyzolovaných protoplastov \pm smerodatná odchýlka. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

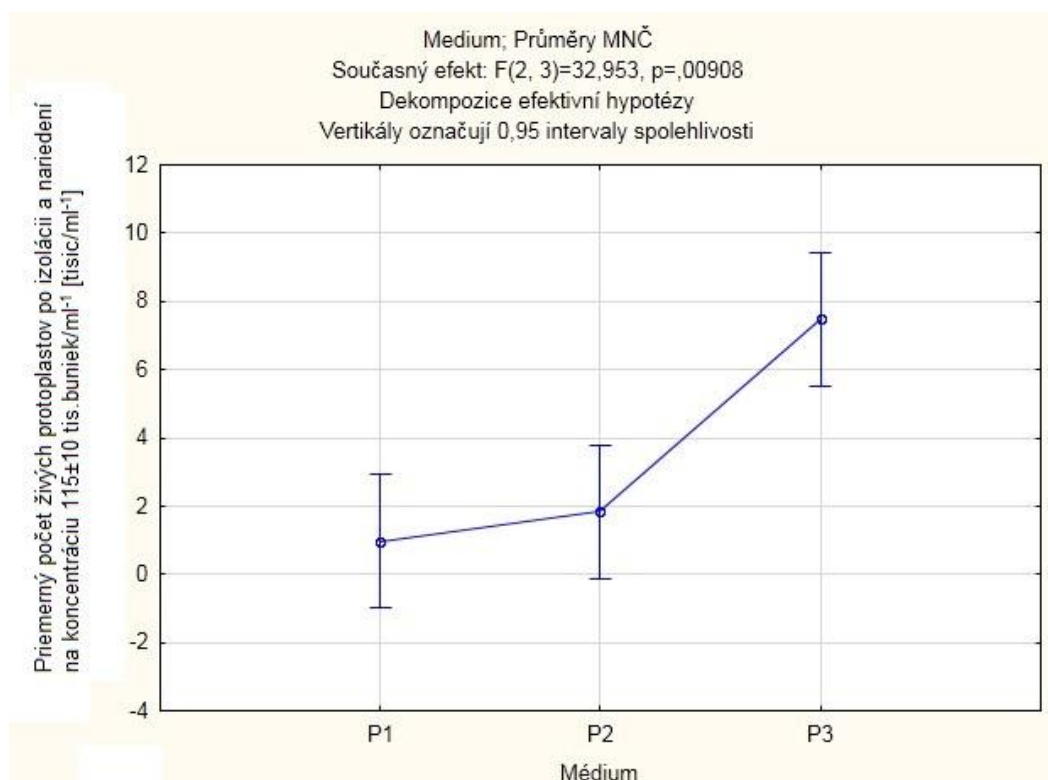


Obrázok 7.: Výsledok izolácie po použití rôznych enzýmov. **a** Protoplasty po purifikácii izolované z čepelí listov druhého páru pomocou lyofilizovaných enzýmov. **b** Protoplasty po purifikácii izolované z čepelí listov druhého páru pomocou tekutých enzýmov.

5.3. Vplyv antioxidantov v digesčnom médiu

V priebehu práce bola optimalizovaná hladina antioxidantov v médiu. Spočiatku bolo v digesčnom médiu použitých 5 g.l^{-1} antioxidantu PVP-10. Táto koncentrácia sa ukázala ako nedostatočná, preto boli testové médiá P1, P2, P3, ktoré obsahovali 5 g.l^{-1} , 10 g.l^{-1} a 15 g.l^{-1} PVP-10 (Tabuľka 4).

Štatistická analýza preukázala signifikantné rozdiely v životaschopnosti protoplastov po izolácii pri použití rôznych koncentrácií PVP-10 v digesčnom médiu. Ako ideálne sa v procese enzymatického uvoľnenia protoplastov ukázalo použitie média P3 so signifikantne vyšším priemerným počtom $7,47 \pm 1,98 \cdot 10^4$ protoplastov. ml^{-1} živých protoplastov (Obrázok 8). Protoplasty izolované pomocou tohto digesčného média vykazovali tesne po izolácii najvyššiu viabilitu, ktorú si zachovali aj v návaznom procese kultivácie a po nasynetizovaní bunkových stien vstupovali do predĺžovacieho rastu. Nižšie hladiny antioxidantov (médiu P1) s priemerným počtom vyizolovaných protoplastov $0,97 \pm 1,97 \cdot 10^4$ protoplastov. ml^{-1} ($\alpha = 0,05$) boli nedostačujúce, čo sa prejavilo už v procese izolácie hneďnutím a degradáciou protoplastov.



Obrázok 8.: Priemerný počet viabilných protoplastov po izolácii vzhľadom na koncentráciu antioxidantov. Priemerné počty vyizolovaných protoplastov \pm smerodatná odchýlka. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

5.4. Vplyv fytohormónov na kultiváciu protoplastov

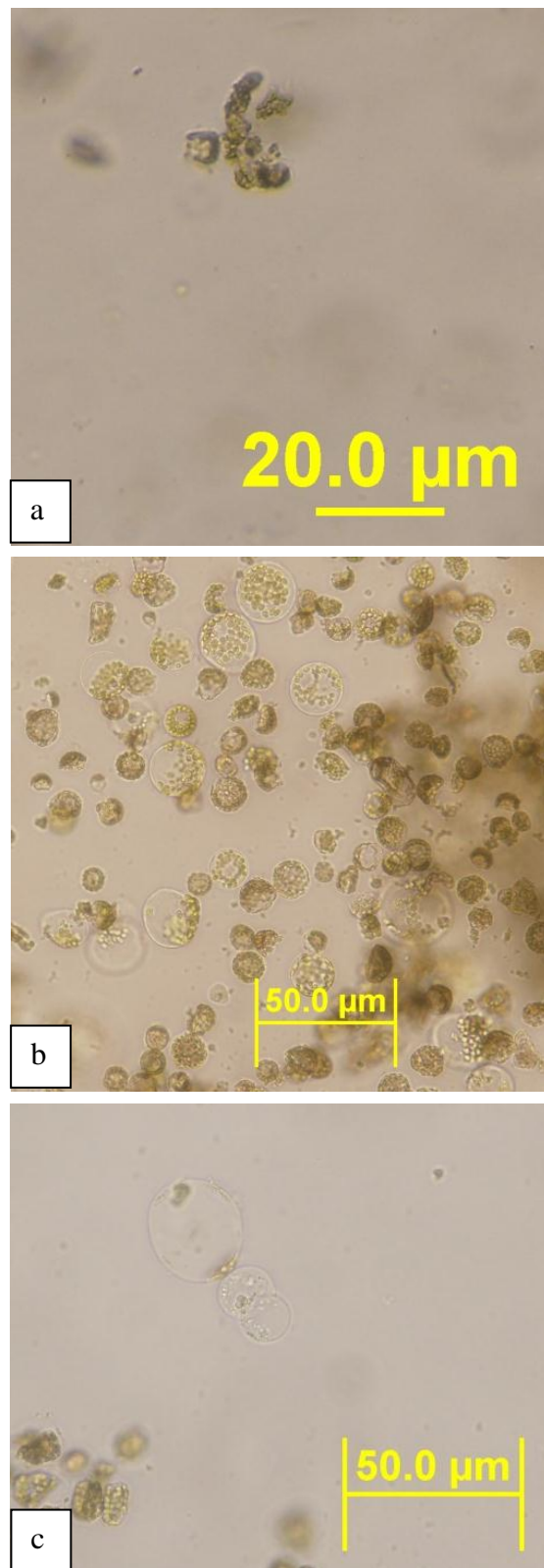
Spočiatku boli protoplasty kultivované na médiu C s prídavkom $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ IAA a $0,05 \text{ g.l}^{-1}$ TDZ. Protoplasty na tomto médiu regenerovali bunkovú stenu (Obrázok 9a), k deleniu buniek ale nedochádzalo, a po čase odumreli. V nasledujúcom procese optimalizácie kultivačného média bol ako auxín použitý IAA v koncentrácii $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ a rôzne koncentrácie cytokinínov: BA, Kinetínu a TDZ (Tabuľka 2) Proces tvorby bunkovej steny a prípadnej regenerácie započal len u protoplastov izolovaných na digesčných médiách P2 a P3. Protoplasty izolované pomocou digesčného média P1 si síce zachovali po izolácii sférický tvar, ale k resyntéze bunkovej steny nedošlo a to bez ohľadu na použitý fytohormón.

V prvých dňoch regenerácie, v procese resyntézy bunkovej steny protoplastov, sa ako najideálnejšie ukázalo použitie médií s nízkymi koncentraciami auxínov v kultivačnom roztoku. A to médiá (B1, B2, K1, K2, T1, T2), ktoré obsahovali nízke hladiny auxínov v kombinácii s $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ cytokinínu. V porovnaní s kontrolou, médiom bez fytohormónov, na ktorom k resyntéze bunkovej steny nedochádzalo (Obrázok 9b), protoplasty na médiách s fytohormónmi resyntetizovali bunkovú stenu približne po 3 ± 1 dňoch kultivácie (Obrázok 9a).

V neskorších štádiách regenerácie najviac prosperovali kultúry, kde bol ako cytokinín použitý BA, alebo Kinetin a auxín IAA v koncentráciách $0,25$ a $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Protoplasty na týchto médiách vstupovali do predlžovacieho (Obrázok 9c) rastu, ale ani po 25 dňoch od kultivácie nebol pozorovaný vznik mikrokalusov. Zvyšujúca sa koncentrácia auxínov nad koncentráciu $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ v kultivačnom médiu nevedla k resyntéze bunkovej steny a mala za následok stratu vitality protoplastov. Tie po 3 ± 1 dňoch kultivácie na týchto médiách odumreli.

5.5. Použitie alginátu sodného

Obaľovanie protoplastov v algináte sódnom sa ukázalo ako vhodná alternatíva tekutých kultivačných médií. Táto metóda je však pre svoju zdĺhavosť nevhodnou v procese optimalizácie zložení kultivačných médií. Preto boli protoplasty kultivované iba na tekutých kultivačných médiách.



Obrázok 9.: Vplyv fytohormónov pri regenerácii protoplastov. **a** Novo-nasyntetizovaná bunková stena po 5. dňoch kultivácie na médiu s prídavkom $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ IAA a $0,05 \text{ g.l}^{-1}$ TDZ. **b** Protoplasty kultivované na médiu bez fytohormónov. **c** Predlžovací rast protoplastov na médiu s fytohormónmi.

6. Diskusia

6.1. Faktory ovplyvňujúce izoláciu protoplastov

6.1.1. Druh enzýmu

V priebehu pokusov izolácie protoplastov *Phlox paniculata* L. boli použité dva typy enzýmov, lyofilizované a enzýmy tekuté. Výsledky ukázali, že typ použitého enzýmu výrazne ovplyvňuje kvantitu, ako aj životaschopnosť vyzolovaných protoplastov. Najväčší výt'azok životaschopných protoplastov (54%) bol pozorovaný u čepelí listov prvého páru od vrcholového meristému izolovaných pomocou tekutých enzýmov (1 % Cellulase (Sigma) a 1,5 % Pectinase (Sigma)). Dosiahnutý výsledok sa zhoduje s výsledkami Pongchawee et al. (2006), ktorí pokusne overili, že použitie Pectinase bolo v procese izolácie protoplastov z mezofylu *Anubias nana* Engler. účinnejšie ako použitie Macerozyme R-10 a to až o 55 %. Pectinase bola s úspechom použitá pri izolácii protoplastov u celej rady druhov ako sú *Lotus corniculatus* (Vessabutr a Grant, 1995) *Pisum sativum* (Durieu a Ochatt, 2000) a *Musa* sp. (Assani et al., 2002). Nagata a Ishii (1979) uvádzajú, že Pectinase má asi 50-krát silnejšiu endo-polygalakturonázovú aktivitu (enzýmy Polygarakturonázy hydrolyzujú Polygalacturonan, ktorý je hlavnou zložkou pektínov tvoriacich bunkové steny rastlín) ako Macerozyme R-10.

6.1.2. Vek donorového materiálu

Pre izoláciu protoplastov boli použité listy vrcholových meristémov a čepele listov prvého a druhé páru, ako aj mladé listy *in vitro* kultúr. V pokusoch bolo zistené, že čepele listov prvého páru od vrcholového meristému vykazovali najvyššie výt'azky ($74,43 \pm 13,07 \cdot 10^4$ protoplastov/ml⁻¹, signifikantne odlišná hodnota na hladine významnosti $\alpha=0,05$) pričom si zachovali najvyššiu životaschopnosť protoplastov spomedzi testovaných variantov. Ak boli ako donorové materiály použité mladé listy (listy vrcholového meristému), prípadne listy staré (listy druhého páru) výt'azok, ako aj životaschopnosť vyzolovaných protoplastov výrazne klesala (Obrázok 7). Pongchawee et al. (2006) použili vo svojich pokusoch na rastlinách *Anubias nana* Engler čepele listov *in vitro* kultúr staré štyri, šesť a osem týždňov, pričom k najvyššiemu výt'azku živých protoplastov dospeli u šesť týždňov starých kultúr ($43,73 \pm 2,81 \cdot 10^5$ protoplastov), čo približne odpovedá vykonaným pokusom s *in vitro* donorovým materiálom predkladaným v diplomovej práci (58,65 tisíc.ml⁻¹).

Podobné experimenty vykonali aj Buiteveld a Creemers-Molenaar (1994) s rastlinami *Allium ampeloprasum* L. a dokázali, že vek listov môže mať vplyv na počet vyizolovaných protoplastov. Nižšia výťažnosť vyizolovaných protoplastov zo starších listov, je obvykle spôsobená nahromadením lignínu v bunkových stenách starších buniek Pongchawee et al. (2006).

6.2. Faktory ovplyvňujúce viabilitu protoplastov

6.2.1. Koncentrácia antioxidantov

Látky, ako napríklad PVP, pridávané do digesčného média nemajú žiaden vplyv pri enzymatickom uvoľňovaní protoplastov z mezofilu rastlín. Slúžila len ako ochranné činidlo pre zníženie možného poškodenia protoplastov, a to najmä ich plazmatických membrán v procese izolácie. Hnednutie kultivačného média je výsledkom oxidácie mono- a difenolov z izolovaných tkanív vylúčených do okolitého prostredia. Hromadenie týchto látok vedie k toxicite digesčných, prípadne kultivačných médií a následnému odumieraniu protoplastov. Ale syntéza týchto metabolitov svedčí o aktivite protoplastov a tak o možnom procese regenerácie (Saxena a Gilli, 1986).

Ako antioxidant bol v pokusoch použitý PVP-10 v koncentráciách 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹ a 15 g.l⁻¹. Zvyšujúca sa koncentrácia PVP-10 výrazne pôsobila na prežívanie protoplastov v prebehu izolácie (Obrázok 8) ako aj v procese ich následnej kultivácie. Použitie prídavku 15 g.l⁻¹ PVP-10 v digesčnom médiu signifikantne podporovalo prežívanie protoplastov 47,77% viabilných protoplastov po izolácii oproti 6,77% viabilných protoplastov pri použití 5 g.l⁻¹ PVP-10 v digesčnom médiu. Schmidt a Poole (1980) použili k úspešnej izolácii protoplastov *Beta vulgaris* L. 0,1 % (w/v) PVP-40 ako prídavok digesčného média. Experimenty, ktoré vykonali Wei et al. (2017) preukázali signifikantné zvyšovanie životaschopnosti protoplastov so zvyšujúcou sa hladinou PVP, v pokusoch použili koncentráciu 0 % - 3 % PVP (w/v) pričom najvyššiu viabilitu si zachovali protoplasty za použitia 2,5 % (w/v) PVP, čo sa zhoduje s pokusmi, opísanými v predkladanej diplomovej práci. Naopak v pokusoch Babaoglu (2000) na rastlinách *Lupinus mutabilis* Sweet. nezaznamenal výrazný rozdiel pri použití 1 % ani 2 % PVP-10 (w/v).

6.3. Faktory ovplyvňujúce kultiváciu protoplastov

6.3.1. Vplyv fytohormónov v kultivačnom médiu

Druh a koncentrácia fytohormónov v kultivačnom médiu výrazne ovplyvňuje bunkové delenie a prežívanie protoplastov, pričom významnú rolu zastáva interakcia prirodzene sa vyskytujúcich endogénnych fytohormónov a koncentrácia fytohormónov pridaných do kultivačného média (Pongchawee et al., 2006). Pri regenerácii protoplastových kultúr sú s úspechom používané auxíny (IAA, NAA, 2,4-D) a cytokiníny (BA, TDZ, Kinetine, Zeatine), pričom rovnováha medzi auxínmi a cytokinínmi je dôležitým faktorom, riadiacim diferenciaciu rastlinných orgánov (Carle et al., 1998).

V priebehu pokusov sa ako najoptimálnejšie ukázalo použitie médií, kde bol ako cytokinín použitý BA, alebo Kinetin spolu s použitím auxínu IAA v koncentráciách 0,25 a 0,5 mg.l⁻¹, čo odpovedá pomeru auxín:cytokinín 1:6 a 1:3. Zvyšujúca sa koncentrácia auxínov pridaných do kultivačného média pôsobila na rast inhibície čomu odpovedajú aj pokusy Pongchawee et al. (2006) so zvyšujúcim sa pomerom auxínu (2,4-D + NAA) voči cytokinínu.

7. Záver

Diplomová práca bola zameraná na izoláciu viabilných protoplastových kultúr, a následné odvodenie prosperujúcej bunkovej kultúry, ktoré sú prvým krokom k vytvoreniu somatických hybridov. V priebehu pokusov izolácie protoplastov bol testovaný *ex vitro*, ako aj *in vitro* donorový materiál, výťažky izolácie boli zisťované pomocou Bürkerovej komôrky a protoplastové kultúry pravidelne kontrolované pomocou optického mikroskopu.

Výskum určil, že pre izoláciu veľkého počtu viabilných protoplastov *P. paniculata* L. sa ako najideálnejšie ukázalo použitie prvého páru listov od vrcholového meristému a to pomocou zrýchlenej metódy izolácie s použitím tekutých enzýmov v koncentrácii 1 % Cellulase a 1,5 % Pectinase, za použitia 15 g.l⁻¹ antioxidantu PVP-10 a koncentrácie osmotík 0,45 M manitolu. Následne kultivovaných na médiách s koncentraciou auxínu 0,25 mg.l⁻¹ IAA a 1,5 mg.l⁻¹ cytokinínu Kinetinu. Pričom kľúčovým prvkom izolácie viabilných protoplastov zostáva dokonalé načasovanie stupňa vyzrenia listových čepelí.

Aj napriek vyizolovaniu životaschopných protoplastových kultúr a použitiu rôznych typov a koncentrácií fytohormónov sa nepodarilo navodiť proces aktívneho delenia buniek. Je preto potrebný ďalší výskum, pri ktorom by bolo vhodné rozšíriť škálu fytohormónov, určiť ich konkrétnejšie koncentrácie odpovedajúce druhu *Phlox paniculata* L., optimalizovať fyzikálne podmienky kultivácie ako aj chemické zloženie kultivačných médií.

8. Prehľad použitej literatúry

Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53 (372). 1331-41.

Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G. B., Foroughi-Wehr, Bakry, F. 2002. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Sci*. 162. 355-362.

Babaoglu, M. 2000. Protoplast Isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Determination of Optimum Explant Sources and Isolation Conditions. *Turk J. Bot*. 24. 177-185.

Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. 1996. *Plant tissue culture: theory and practice*. Second edition. Elsevier. Amsterdam. s 766. ISBN 0-444-81623-2.

Blackhall, N. W., Davey M. R., Power J. B. 1994. Isolation, culture and regeneration of protoplasts. In: Dixon, R. A., Gonzales, R. A. (ed.). *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. Second edition. Oxford University Press. New York. s. 27-39. ISBN 0-19-963402-5.

Böhm, Č. 1991. *Trvalky: ozdoba zahrady i bytu*. Nakladatelství Českého zahrádkářského svazu Květ. Praha. 112 s. ISBN 8085362066.

Bowler, C, Van Montagu M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology molecular biology Journal*. 43. 83-116.

Brickell, CH. 2008. *A-Z encyklopedie zahradních rostlin*. 1. vyd. Praha: Knižní klub. 1128 s. ISBN 978-80-242-2069-7.

Buiteveld, J., Creemers-Molenaar, J. 1994. Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension culture of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant Sci*. 100. 203-210.

Carle, S. A., Bates, G. W., Shannon, T. A. 1998. Hormonal control of gene expression during reactivation of the cell cycle in tobacco mesophyll protoplasts. *Journal of Plant Growth Regulation*. 17. 221-230.

Cell Types and Culture Characteristics. 2010. *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*. 2nd. Cook Book (ed.). Sept 2010. Volume 12.

- Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*. 187. 962–963.
- Cosgrove, D. J. 2001. Wall structure and wall loosening: a look backwards and forwards. *Journal of Plant Physiology*. 125. 131-134.
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6. 850-861.
- Crowder, A. J., Landgren, C. R., Rockwood, L. L. 1979. Cultivar differences in starch content and protoplast yields from root cortical explants of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*. 46. 85-88.
- Das, N. K., Patau, K., Skoog, F. 1956. Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indole acetic acid in excised tobacco pith tissue. *Journal of Plant Physiology*. 9. 640–651.
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., Lowe, K. C. 2005. Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27. 117-129.
- Draget, K. I., Ostgaard, K., Smidsrod, O. 1989. Alginate-based solid media for plant tissue culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 31. 79-83.
- Durieu, P., Ochatt, S.J. 2000. Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. *Journal of Experimental Botany*. 51. 1237-1242.
- De Marco, A., Roubelakis-Angelakis, K. A. 1996. Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts. *Journal of Plant Physiology*. 149. 109-114.
- Dhillon, S, Miksche, J. 1981. DNA changes during sequential leaf senescence of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Plant Physiology*. 51. 291–298.
- Evans, D. A., Bravo J. E. 1983. Protoplast isolation and culture. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., Yamada, Y. ed. *Handbook of Plant Cell Culture*. vol. 1. MacMillan. New York. pp. 124-177.
- Faraco, M. Di Sansebastiano, G.P., Spelt, K., Koes, R. E., Quattrocchio, F. M. 2011. One protoplast is not the other. *Journal of Plant Physiology*. 156. 474-478.

- Gamborg, O. L., Shyluk, J. P., Kartha, K. K. 1975. Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from shoot apices of *Pisum sativum* L. *Plt. Science Lett.* 4. 285-292.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soyabean root cells. *Experimental Cell Research* 50. 151-158.
- Grafi, G. 2004. How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology.* 268. 1-6.
- Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R., Ducreu, G. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. *C. R. Biologies.* 330. 392–401.
- Chang, M. M., Loescher, W. H. 1991. Effects of preconditioning and isolation conditions on potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) protoplast yield for shoot regeneration and electroporation. *Plant Science Journal.* 73. 103-109.
- Chawla, H. S. 2002. Introduction to plant biotechnology. 1nd ed. Science Publishers. Enfield. New Hampshire. s. 87-89. ISBN 1-57808-228-5.
- Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell.* 16 (5). 1143-62.
- Cheng, J., Saunders, J. A. 1995. Protoplast Electrofusion and Regeneration in Potato. In: *Methods in Molecular Biology.* In: Nickoloff, J. A. (ed.). *Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols.* Totowa. NJ. 55. 181 – 188.
- Jain, R. K., Khera G. S., Lee S. H., Blackhall, N. W., Marchant, R., Davey, M. R., Power, J. B., Cocking, E. C. 1995. An improved procedure for plant regeneration from indica and japonica rice protoplasts. *Plant Cell Rep.* 14. 515-519.
- Kanai, R. Edwards, G. E. 1973. Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Journal of Plant Physiology.* 51. 1133-1137.
- Kao, K.N., Michayluk, M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta (Berl.).* 126 - 105.

Kyozuka, J., Hayashi, Y., Shimamoto, K. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol Gen Genet* 206. 408-413.

Kliebenstein, D. J., Monde R. A., Last, R. L. 1998. Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Journal of Plant Physiology*. 118. 637–650.

Kubitzki, K., Rohwer, J. G., Bittrich, V. (ed.) 1993. *The Families and Genera of Vascular Plants. II Flowering plants - Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families*. Berlin. Springer. ISBN 3540555099.

Larkin, P. J., Davies, P. A., Tanner, G. J. 1988. Nurse culture of low numbers of *Medicago* and *Nicotiana* protoplasts using calcium alginate beads. *Plant Sci*. 58. 203-210.

Lei, R., Qiao, W., Hu, F., Jiang, H., Zhu, S. 2014. A simple and effective method to encapsulate tobacco mesophyll protoplasts to maintain cell viability. *Methods*. 2. 24–32.

Locklear, J.H. 2011. *Phlox: A Natural History and Gardener's Guide*. Timber Press. London. p. 340. ISBN 978-0881929348.

Lung, S. C., Yanagisawa, M., Chuong, S. D. X. 2011. Protoplast isolation and transient gene expression in the single-cell C4 species. *Bienertia sinuspersici*. *Plant Cell Rep*. 30. 473-484.

Lung, S.C., Schoor, S., Sigurdsson, D., Yanagisawa, M., Yeung K., Liu, M. Q., Chuong, S. D. X. 2015. Protoplast isolation and staining. In: Yeung, E. C. T., Stasolla C., Sumner M. J., Huang B. Q. (ed.). *Plant microtechniques and protocols*, p. 197-211. Cham, Switzerland: Springer International Publishing. 2015. ISBN: 978-3-319-19944-3.

Luštinec, J., Žárský, V. 2005. Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. 40-45.

McClung, C. R. 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*. 23. 489-496.

Melchers, G., Sacristán, M. D., Holder, A. A. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg research communications*. 43 (4). 203-218.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002 Sep. 7 (9). 405-10.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* Vol. 15. p. 473-497.

Nagata, T., Takebe, I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta.* 99 (1). 12-20.

Nagata, T., Ishii, S. 1979. A rapid method for isolation of mesophyll protoplast. *Can. J. Bot.*, 57: 1820-1823.

Neill, S. J., Desikan R., Hancock J. T. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 5. 388-395.

Novák, J., Skalický, M. 2012. *Botanika: cytologie, histologie, organologie, systematika.* 3. vydanie. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788087415535.

O'Neill, C. M., Mathias, R. J. 1993. Regeneration of plants from protoplasts of *Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia (C24), via direct embryogenesis. *Journal of Experimental Botany.* 44. 1579-1585.

Ochatt S. J., Power, J. B. 1992. Plant Regeneration from Cultured Protoplasts of Higher Plants. In: Fowler, M. W., Warren, G. S., Moo-Young, M. (ed.). *Plant Biotechnology. Comprehensive Biotechnology Second Supplement.* Pergamon Press. Oxford. New York. s. 99-104. ISBN 0-08-034731-2.

Panis, B., Wauwe, A. V., Swennen, R. 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.) *Plant Cell Reports.* 12. 403-407.

Papadakis, A. K., Kalliopi. A., Roubelakis-Angelakis K. A. 2002. Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant Protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40. 549–559.

Park, J. K., Park, S., Craven, J., E. 2012. Protoplast Isolation and Fusion. In: Smith R. H. (ed.). *Plant tissue culture Techniques and Experiments*, 3rd ed. Academic Press. London. s. 147-149. ISBN 978-0-12-415920-4.

Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H. A., Dudits, D., Feher, A. 2002. The role of auxin, pH and stress in the

activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of Alfalfa. *Journal of Plant Physiology*. 129. 1807-1819.

Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. 2005. Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy*. 99. 455-466.

Pitzschke, A., Persak, H. 2012. Poinsettia protoplasts - a simple, robust and efficient system for transient gene expression studies. *Plant Methods*. 8. 14.

Pongchawee, K., Na-Nakorn, U., Lamseejan, S., Poompuang, S., Phansiri, S., 2006. Factors affecting the protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. *International Journal of Botany*, 2 (2). 193-200.

Power, J. B., Cocking, E. C. 1969. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. *Biochem. J.* 111 (5). p. 33.

Raveh, D., Huberman E., Galun, E. 1973. In vitro culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. *In Vitro*. 9. 216-222.

Saxena, P. K. Gilli, R. 1986. Removal of browning and growth enhancement by Polyvinylpyrrolidone in protoplast cultures of *Cyamopsis tetragonoloba* L. *Biol. Plant*. 28 (4). 313-315.

Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38. 995-1014.

Shepard, J. F., Totten, R. E. 1975. Isolation and regeneration of tobacco mesophyll cell protoplasts under low osmotic conditions. *Journal of Plant Physiology*. 55. 689-694.

Smidsrod, O. 1972. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discuss Chem Soc*. 57. 263-274.

Schmidt, R., Poole R. J. 1980. Isolation of Protoplasts and Vacuoles from Storage Tissue of Red Beet. *Plant Physiol*. 66. 25-28.

Steeves, T. A., Sussex, I. M. 1989. *Patterns in Plant Development*. 2nd ed. Cambridge Univ. Press Cambridge. UK. ISBN 13-9780521288958.

- Sutiojono, E., Nonhebel, H. M., Kantharajah, A. S. 1998. Factors affecting protoplast culture of Cucumis melo "Green Delica". *Annals of Botany Journal*. 81. 775–777.
- Takebe, I., Nagata, T. 1984. Isolation and culture of protoplasts: tobacco. In: Vasil, I. K. (ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 1. Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press. San Diego. s. 328-339. ISBN 0-12-715001.
- Uchimiya, H. T. Murashige, T. 1976. Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant PhysioJ*. 57. 424-429.
- Vacca, R. A., Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., Gara, L. 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Journal of Plant Physiology*. 134 (3). 1100-12.
- Veilleux, R. E., Compton, M. E., Saunders, J. A. 2005. Use of protoplasts for plant improvement, pp. 213 - 224. Trigiano, R. N., Gray, D. J. (ed.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton. London. ISBN: 0849316146.
- Vessabutr, S., Grant, W.F. 1995. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 41. 9-15.
- Vranová, E., Inzé D., Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53 (372). 1227-36.
- Watanabe, Y., Meents, M. J., McDonnell, L. M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H. N., Demura, T., Ehrhardt, D. W., Samuels, A. L., Mansfield, S. D. 2015. Visualization of cellulose synthases in Arabidopsis secondary cell walls. *Science* 9. October 2015. 350 (6257). 198-203.
- Wei, L. N., Wai. Y. Y., 1, May, W. N. 2017. Polyvinylpyrrolidone-Based Bio-Ink Improves Cell Viability and Homogeneity during Drop-On-Demand Printing. *Material*. 10 (2). 190.

9. Zoznam skratiek

BA – benzyladenín

B5 – (Gamborg et al., 1968), kultivačné médium

FDA – fluorescín diacetát

H₂O₂ – peroxid vodíka

IAA – β-indolyloctová kyselina

MS – (Murashige a Skoog, 1962) kultivačné médium

NAA – kyselina naftyloctová

O₂ – molekulárny kyslík

O₂^{•-} – superoxidový radikál

¹O₂ – singletový kyslík

OH• – hydroxylový radikál

PVP-10 – polyvinylpyrrolidon

ROS – reaktívne formy kyslíka

TDZ – thidiazurón

2,4 D – kyselina 2,4 dichlórfenoxyoctová

10. Zoznam obrázkov

Obrázok 1.: Reakcia protoplastov na fytohormóny v kultivačnom médiu.	11
Obrázok 2.: Postup izolácie protoplastov z listového mezofylu.....	16
Obrázok 3.: Počítanie protoplastov.....	18
Obrázok 4.: Priemerný počet vyizolovaných protoplastov podľa veku donorového materiálu.....	32
Obrázok 5.: Vplyv veku donorového materiálu pri izolácii.....	33
Obrázok 6.: Výťažok protoplastov vzhľadom na typ použitého enzýmu.....	35
Obrázok 7.: Výsledok izolácie po použití rôznych enzýmov.....	36
Obrázok 8.: Priemerný počet viabilných protoplastov po izolácii vzhľadom na koncentráciu antioxidantov.....	37
Obrázok 9.: Vplyv fytohormónov pri regenerácii protoplastov.....	39

11. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1.: Zloženie roztokov média Cheng and Sounders.....	25
Tabuľka 2.: Koncentrácia fytohormónov v kultivačných médiách.....	27
Tabuľka 3.: Zloženie roztokov alginátového média.....	29
Tabuľka 4.: Zloženie digesčných médií s antioxidantmi.....	32