

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Protoplastové kultury kvěťáku *Brassica oleracea* L. var.
botrytis (L.)

Diplomová práce

| | |
|-------------------|---|
| Jméno a příjmení: | Michaela Fojtíková |
| Studijní program: | Chemie |
| Studijní obor: | Učitelství chemie pro střední školy, Učitelství biologie pro střední školy |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D. |
| Olomouc 2019 | |

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím materiálů uvedených v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne:

.....

Michaela Fojtíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Vladanovi Ondřejovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnoval v průběhu zpracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení: Michaela Fojtíková

Název práce: Protoplastové kultury květáku *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* (L.)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Rok obhajoby: 2019

Abstrakt: V teoretické části diplomové práce je popsána čeleď brukvovité (Brassicaceae), následuje objasnění pojmu protoplasty. Významná část je věnována podmínkám, požadavkům a postupům izolace protoplastů. Teoretickou část uzavírají informace shrnující somatickou hybridizaci protoplastů. V praktické části je sledována hustota, životnost a regenerace květáku (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), odrůd Bora, Beta, Igloo, Snowball X, Poranek a Octavian. Nejvyšší hustota s životností byly pozorovány u odrůdy Bora, naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u odrůdy Octavian.

Klíčová slova: Protoplasty, květák, izolace, životnost, hustota, regenerace, RVP

Počet stran: 56

Počet příloh: 1

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's name and surname: Michaela Fojtíková

Title: Protoplast cultures of cauliflower *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* (L.)

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Faculty of Science,
Palacky University, Olomouc

Supervisor: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract: The theoretical part of the Diploma's thesis describes the Brassicaceae family, followed by the explanation of the term protoplasts. Significant part is devoted to conditions, requirements and procedures of protoplast isolation. The theoretical part concludes with informatik summarizing static hybridization od protoplasts. The practical part is focused on density, viability and regeneration of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), varieties Bora, Beta, Igloo, Snowball X, Poranek and Octavian. The highest density and viability were observed for the Bora variety, while the lowest values were found for the Octavian variety.

Keywords: protoplasts, cauliflower, isolation, viability, density, regeneration, RVP

Number of pages: 56

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1.1 | Brukvovité (Brassicaceae) | 11 |
| 1.2 | Protoplasty | 12 |
| 1.3 | Historie | 13 |
| 1.4 | Izolace protoplastů..... | 14 |
| 1.4.1 | Zdroj rostlinného materiálu | 15 |
| 1.4.2 | Enzymy..... | 15 |
| 1.4.3 | Osmotický stabilizátor..... | 17 |
| 1.4.4 | Purifikace protoplastů | 17 |
| 1.4.5 | Životnost a hustota protoplastů | 18 |
| 1.5 | Kultivace protoplastů..... | 18 |
| 1.5.1 | Kultivační media | 19 |
| 1.5.2 | Nutriční požadavky | 20 |
| 1.5.3 | Vnější podmínky při kultivaci protoplastů | 21 |
| 1.6 | Regenerace rostlin z protoplastů..... | 22 |
| 1.7 | Uspořádání chromatinu a stresové podmínky při protoplastizaci | 22 |
| 1.8 | Somatická hybridizace..... | 24 |
| 1.8.1 | Chemická fúze..... | 27 |
| 1.8.2 | Elektrofúze | 28 |
| 1.8.3 | Mechanismus fúze..... | 29 |
| 1.8.4 | Výsledek fúze | 29 |
| 1.8.5 | Výběr hybridů | 30 |
| 1.8.6 | Identifikace hybridů | 31 |
| 1.9 | Genom brukvovité (Brassicaceae)..... | 32 |
| 2 | MATERIÁL A METODY | 34 |
| 2.1 | Pěstování rostlin | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2 | Izolace protoplastů..... | 35 |
| 2.3 | Hustota a životnost protoplastů | 35 |
| 3 | PRAKTICKÁ ČÁST S VÝSLEDKY..... | 37 |
| 4 | DISKUZE | 39 |
| 5 | DIDAKTICKÁ ANALÝZA A ZPRACOVÁNÍ TÉMATU..... | 42 |
| 5.1 | Přírodopis a biologie v Rámcovém vzdělávacím programu (RVP) | 42 |
| 5.2 | Didaktické hry | 43 |
| 5.2.1 | Didaktické hry pro základní školy a nižší stupeň víceletých gymnázií | 44 |
| 5.2.2 | Didaktické hry pro vyšší stupeň gymnázií | 47 |
| 6 | ZÁVĚR | 49 |
| 7 | LITERATURA | 50 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 56 |

Úvod a cíle práce

Od pradávna jsou rostliny využívány jako zdroj potravy pro lidi i zvířata, často nacházely a stále nachází využití v léčitelství při léčbě mnoha nemocí. Avšak až objasnění struktury rostlinné buňky otevřelo vědcům široké spektrum nového využití i podnětů k bádání. V současnosti je známa detailní stavba i chemické složení buněk. Pro řadu struktur rostlinné buňky jsou známy vhodné izolační postupy, nejinak je tomu u protoplastů. Protoplasty jsou bakteriální, houbové a rostlinné buňky sférického tvaru, zbaveny buněčné stěny a schopné dediferenciace. Dediferenční procesy obnovují u rostlinných buněk totipotenci a tím schopnost regenerace protoplastů v novou rostlinu. Protoplasty je možné izolovat z řady jednoděložných i dvouděložných rostlin z různých orgánů. Dodržováním doporučených izolačních postupů a následnou kultivací ve vhodném kultivačním mediu s růstovými regulátory, mohou protoplasty vstupovat do buněčného cyklu, proliferovat a regenerovat v novou rostlinu. Lze provádět i proces nazývaný somatická hybridizace. Podstatou tohoto procesu je fúze protoplastů mezi sexuálně nekompatibilními rostlinnými druhy nebo mezi odlišnými rostlinnými rody. Účelem somatické hybridizace je zdokonalování genetické informace zemědělských rostlin, např. přenos genů rezistentních vůči patogenům, odolnost vůči stresorům, kumulace toxických nebo naopak žádoucích látek, i když v současnosti jsou efektivnější metody genetických transformací (produkce GMO).

Zástupci čeledi brukvovité (Brassicaceae) jsou často využívanými rostlinami pro somatickou hybridizaci. Je známo 338 rodů a 3 709 druhů rozšířených po celém světě. Jedná se často o nenáročný plevel, zemědělské i okrasné rostliny. Významným zástupcem je morfologicky variabilní brukev zelná (*Brassica oleracea*), jsou známy odrůdy kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*), brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*), květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) atd. Literatura popisuje mezidruhové i mezirodové hybridy.

Předložená diplomová práce je tvořena částí teoretickou a praktickou. V teoretické části je popsána čeleď brukvovité (Brassicaceae), následuje objasnění termínu protoplast a celého procesu úspěšné izolace a kultivace protoplastů. V praktické části byly izolovány protoplasty kvěťáku (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), konkrétně šesti odrůd – Bora, Beta, Snowball X, Poranek, Igloo a Octavian. A vyhodnocena hustota a životnost protoplastů. Hustota se stanovovala pomocí Bürkerovy počítací komůrky, životnost se vyhodnocovala

pomocí fluorescenčního mikroskopu (hranol WB) po zreagování protoplastové suspenze s fluorescein diacetátem. Bylo provedeno trojí měření hustoty i životnosti každé odrůdy.

V diplomové práci byly stanoveny následující cíle:

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Kultivace rostlin květáku min. dvou genotypů *in vitro* a izolace protoplastů.
4. Vyhodnocení izolace a následné kultivace protoplastů (výtěžnost, viabilita, regenerace).
5. Květák a příbuzné zeleniny jako didaktický materiál.
6. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Brukvovité (Brassicaceae)

Čeď brukvovité (Brassicaceae) zahrnuje 338 rodů a 3 709 druhů rozšířených po celém světě. Nej hustěji osídlená stanoviště jsou ve Středozeří a v západní a střední Asii. [1]. Většinou jsou to byliny se střídavými jednoduchými až laločnatými listy, bez palistů. Květy rostlin jsou oboupohlavné, heterochlamydní, aktinomorfni a vytváří hroznovitá květenství. Plodem je šešule, šešulka, struk nebo nažka. U některých zástupců, např. křene a ředkve jsou přítomny glukosinoláty a enzym myrosináza. Zpracováním plodin se poškodí pletiva a reakcí výše uvedených látek se uvolňuje glukóza a hořčičné silice, které způsobují slzení a současně se vyznačují fytocidními účinky. V semenech se kumuluje olej a nenasycené mastné kyseliny. V listech mnoha druhů je vysoký obsah vitamínu C [2, 3].

Zástupci čeledi brukvovité (Brassicaceae) se pěstují po celém světě jako plodiny pro lidskou spotřebu, jako krmivo pro hospodářská zvířata a využívají se jako koření k dochucení pokrmů. Čeď je různorodá, zahrnuje více než 120 druhů plevelů, ale také okrasné rostliny, patří mezi ně např. trýzel (*Erysimum*), štěničník (*Iberis*), tařicovka (*Lobularia*), večerňička (*Malcolmia*), fiala (*Matthiola*).

Významným rodem je brukev (*Brassica*). Známými plodinami jsou brukev řepka (*Brassica napus*), brukev řepák (*Brassica rapa*) a brukev sítinovitá (*Brassica juncea*), patří mezi medonosné rostliny a jejich zpracováním se získává pokrmový nebo technický olej [4]. Běžnou plodinou vyznačující se vysokou morfologickou variabilitou je brukev zelná (*Brassica oleracea*). Mezi známé odrůdy patří – větevnatá kapusta (*Brassica oleracea* var. *ramosa*), růžičková kapusta (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*), květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*), zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Všechny plodiny se využívají ke konzumaci. Plodinami bohatými na vitamíny, bílkoviny a minerální látky jsou pekingské zelí (*Brassica pekinensis*) a čínské zelí (*Brassica chinensis*), původem z východní Asie. Rozsáhlé využití lze nalézt u hořčice seté (*Sinapis alba*), tato jednoletá rostlina s lyrovitými listy, světle žlutými květy a chlupatými šešulemi se pěstuje jako olejnína na výrobu oleje technického, semena se využívají jako koření nebo k výrobě plnotučné stolní hořčice.

Druhým významným rodem brukvovitých (Brassicaceae) je ředkev (*Raphanus*). Důležitým zástupcem je ředkev setá (*Raphanus sativus*) s tenkým kořenem nebo bulvou. Pěstuje se v zahradách a na polích. Vyskytuje se v mnoha kultivarech, význam má především ředkev setá ředkvička s kulovitým nebo válcovitým hypokotylem, ředkev setá letní a ředkev setá zimní. Všechny ředkve se využívají jako zelenina ke konzumaci [2]

1.2 Protoplasty

Buněčná stěna rostlinných buněk je celulózní a vytváří primární buněčnou stěnu a v některých případech i sekundární buněčnou stěnu. Primární buněčnou stěnu tvoří vnější stěna bohatá na celulózní vlákna a střední lamela s vysokým obsahem pektinů, které propojují sousední buňky. Sekundární stěna vzniká mezi primární stěnou a cytoplazmatickou membránou. Mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou je udržován těsný kontakt, důvodem je schopnost membrány podílet se na syntéze buněčné stěny. Enzymatickým nebo mechanickým zásahem je možné buněčnou stěnu z rostlinné buňky odstranit. Konkrétně v hypertonických roztocích se plazmatické membrány buněk stahují ze svých stěn, jejich odstraněním se uvolňují sférické a osmotické křehké útvary, které se nazývají protoplasty. Protoplasty jsou bakteriální, houbové a rostlinné buňky sférického tvaru, zbavené buněčné stěny a schopné dediferenciace. Životoschopné protoplasty jsou potenciálně totipotentní. Pokud jsou protoplastům během izolace a následné kultivace podávány vhodné chemické a fyzikální stimuly. Potom je každý protoplast teoreticky schopen regenerovat novou buněčnou stěnu a podléhat opakovanému mitotickému dělení za vzniku dceřiných buněk, ze kterých mohou vzniknout nové rostliny [5]. Rostliny mohou regenerovat z buněk listů, kořenů, stonků, květních částí, endospermu a v *in vitro* podmínkách i z izolovaných gametických buněk. Schopnost zralých buněk vracet se do meristemické fáze se nazývá jako dediferenciace. Mezi nejúspěšnější čeledi regenerovat rostliny z protoplastů patří lilkovité (Solanaceae), hvězdnicovité (Asteraceae), bobovité (Fabaceae), brukvovité (Brassicaceae) [6].

1.3 Historie

Prvního průlomů v izolaci protoplastů dosáhl v roce 1892 Klercker, který izoloval protoplasty z řezanu pilolistého (*Stratiotes aloides*) pomocí mechanických nástrojů. V prvním kroku plazmolýzoval buňky v izotonickém roztoku, poté uvolnil protoplasty narušením buněčné stěny skalpelem. Metoda byla úspěšná, avšak měla několik nevýhod. Vyznačovala se nízkou výtěžností protoplastů a byla limitována pouze pro silně vakuolizované buňky [7]. Nevýhody mechanické metody byly překonány objevením enzymatického štěpení buněčných stěn. A především od roku 1968 komerční dostupností enzymů. Celuláza, hemicelulóza a pektináza byly izolovány z hub *Trichoderma viride* a *Rhizopus sp* [8]. Enzymatického štěpení využil v roce 1960 Cocking k izolaci protoplastů ze špiček kořene rajčete (*Lycopersicon esculentum*), použil k tomu celulázu izolovanou z houby *Myrothecium verrucaria*. Metoda se vyznačuje několika výhodami. Protoplasty je možné izolovat z téměř každé části rostliny, nedochází k jejich poškození jako u mechanické metody a izolují se velké populace protoplastů [9]. V 60. letech 20. století byly úspěšně izolované protoplasty z listů tabáku dvoustupňovou enzymatickou metodou. V prvním kroku bylo rostlinné pletivo macerováno v pektináze, to vedlo k uvolnění mezofylových buněk a poté se vzniklá suspenze přenesla do celulázy, která rozštěpila buněčné stěny a tím se usnadnilo uvolnění protoplastů [10]. O pár let později se izolace protoplastů zjednodušila z dvoustupňové na jednostupňovou metodu. Listy tabáku se inkubovaly ve směsi pektinázy a celulázy současně se srovnatelnou výtěžností jako u první zmíněné metody [11].

Důležitým krokem vpřed byla příprava MS [12] a B5 media [13]. Z kombinace a množství makroprvků a mikroprvků MS media se dále vycházelo při přípravě ostatních medií. Nagata a Takebe vyvinuli techniku vedoucí k regeneraci celé rostliny z tabákových mezofylových protoplastů. V roce 1972 vznikl první mezidruhový hybrid fúzí tabáku sivého (*Nicotina glauca*) a tabáku jihoamerického (*Nicotina langsdorffii*) [14]. V tomto desetiletí byly potvrzeny pozitivní účinky dusičnanu sodného na fúzi protoplastů u obilovin [15] a také fúze indukovaná polyethylenglykolem (PEG) [16]. V roce 1978 vědci dokázali mezidruhovou fúzi protoplastů lilku brambory (*Solanum tuberosum*) a rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) vytvořit hybridní buňky, ze kterých se regenerovaly celé rostliny. Jeden hybrid obsahoval ve svých buňkách chloroplasty brambor (*Solanum tuberosum*), druhý hybrid chloroplasty rajčat (*Solanum lycopersicum*). Nevýhodou hybridů byla neschopnost vytvářet květy. Vznik hybridních buněk

mezidruhovým pohlavním křížením by nebyl možný [8]. V 80. letech 20. století došlo k průlomům ve fúzi protoplastů, chemickou fúzi doplnila fúze zprostředkovaná elektrickým polem, tzv. elektrofúze [17].

Dále se výzkum zaměřil na stimulaci protoplastů elektrickým polem, což vedlo ke zvýšení mitotického dělení. Na konci 20. století se oblast studující protoplasty zabírala genetickou manipulací rostlin prostřednictvím fúze a transformací protoplastů [15].

1.4 Izolace protoplastů

Izolace protoplastů je komerčně používaná metoda, jejíž jednotlivé izolační postupy se po desetiletí zdokonalovaly pouze minimálně. Progres lze pozorovat především v počtu druhů, u kterých je izolace protoplastů reálná [9]

Izolaci je možné provést mechanickým a enzymatickým způsobem. Původní mechanická izolace v současnosti nenachází praktické využití. Důvodem je náročná manipulace a limitovaný výběr vhodných rostlin (viz. Historie) [18]. Využívanějším postupem je enzymatická izolace. Taktéž u této metody jsou určitá omezení, vztahuje se pouze na parenchymální buňky s nelignifikovanými buněčnými stěnami. Důvodem je rezistence lignifikovaných buněčných stěn vůči enzymům. Podstatou enzymatického štěpení je schopnost celulózy a pektinázy štěpit celulózní buněčné stěny za vzniku sférických protoplastů. Mezi další výhody patří získání velkého množství buněk, minimální riziko jejich poškození a možnost ovlivňovat osmotické podmínky. Enzymatickou izolaci je možné provést dvoustupňovou nebo jednostupňovou metodou. V prvním kroku dvoustupňové metody se ke zkoumanému vzorku aplikuje komerční enzymatický preparát (např. Macerozym). Enzym degraduje střední lamelu a pletivo se rozpadá na jednotlivé buňky. Ve druhém kroku se použitím celulózy (celulóza Onozuka R-10) rozpustí buněčná stěna a uvolní se protoplasty. Využití jednostupňové metody je častější. Rostlinný vzorek se vloží do směsi enzymů pektinázy a celulózy. U jednostupňové metody je vzorek macerován v enzymech delší dobu. Důležitá je optimalizace složení enzymatické směsi pro každý rostlinný druh [8].

Úspěšné izolace lze docílit dodržováním určitých kritérií. Především použití vhodného zdroje rostlinného materiálu, zvolit vhodnou kombinaci enzymů ke štěpení buněčné stěny, udržovat optimální osmotické podmínky a dodržovat postupy při promývání protoplastů.

1.4.1 Zdroj rostlinného materiálu

Nejvhodnějším materiálem jsou mladé lístky z *in vitro* rostoucích aseptických kultivací. Důvodem jsou volně uspořádané mezofylové buňky v listech, umožňující enzymům volný přístup k buněčné stěně [6]. Záznamy uvádí izolaci protoplastů mimo jiné z mezofylových buněk *in vivo* rostoucích rostlin, aseptických sazenic, kotyledonů, kalusů, hypokotylů, řapíků, pylových zrn, samičích gamet a buněčných suspenzí. U rodu *Brassica* se jako vhodný zdroj využívají mezofylové buňky listů [8].

1.4.2 Enzymy

Při maceraci rostlinného vzorku v enzymatickém roztoku se využívají celulózy, hemicelulózy a pektinázy. Enzymy se izolují z houbových organismů (*Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*) organismů. Při izolaci protoplastů se enzymy vzájemně kombinují. Právě kombinování enzymů a zdokonalování izolačních postupů umožnilo izolovat protoplasty z téměř všech druhů rostlinných pletiv. Mezi komerčně dostupné a často využívané enzymatické preparáty patří Celulóza Onozuka RS, Cellulóza R-10, Macerozym R-10 a Pektináza Y-23, mimo to jsou známy Driseláza, Helikáza a Hemicelulóza. V Tabulce 1 jsou uvedeny enzymatické preparáty se zdroji, ze kterých byly enzymy izolovány [19]. Často je součástí enzymatického preparátu pektináza s celúzou. Pektináza rozpouští střední lamelu mezi jednotlivými buňkami a celulóza štěpí buněčné stěny a následně uvolňuje protoplasty. V některých případech je nutné k uvolnění protoplastů použít hemicelulózu.

V komerčně dostupných enzymech byla prokázána přítomnost nečistot (fenoly, proteolytické enzymy a soli), které mohou nepříznivě ovlivnit životaschopnost a výtěžnost protoplastů. Proto je doporučováno enzymatický roztok čistit filtrací přes Sephadex G-25 nebo adsorpcí nečistot na aktivní uhlí. Kombinace a koncentrace enzymů je důležité upravit provedením několika experimentů na vybraném rostlinném materiálu [6].

| Enzym | Zdroj |
|-----------------------|------------------------------|
| Celuláza | |
| Celuláza Onozuka R-10 | <i>Trichoderma viride</i> |
| Celuláza Onozuka RS | <i>Trichoderma viride</i> |
| Meiceláza P-1 | <i>Trichoderma viride</i> |
| Driseláza | <i>Irpex lacteus</i> |
| Celuláza YC | <i>Trichoderma viride</i> |
| Celulizin | <i>Trichoderma viride</i> |
| Celuláza CEL | <i>Trichoderma viride</i> |
| | |
| Hemiceluláza | |
| Helikáza | <i>Helix pomatia</i> |
| Hemiceluláza | <i>Aspergillus niger</i> |
| Rhozyme HP150 | <i>Aspergillus niger</i> |
| | |
| Pektináza | |
| Macerozym R-10 | <i>Rhizopus arrhizus</i> |
| Pectolyáza Y-23 | <i>Aspergillus japonicus</i> |
| Maceráza | <i>Rhizopus arrhizus</i> |
| PATE | <i>Bacillus polymyxa</i> |

Tabulka 1: Seznam enzymů

Hustota a životnost izolovaných protoplastů závisí na pH a teplotě enzymatického roztoku, době inkubace v enzymatickém roztoku a poměru enzymatického roztoku k objemu rostlinného materiálu. Hodnotu pH je vhodné ustálit v rozmezí 4,7–6. A rostlinný materiál inkubovat při 25–30°C. Vyšší teplota by mohla vést k poškození buněk. Suspenze rostlinného materiálu se může inkubovat krátkodobě v rozmezí 2–6 hodin, nebo dlouhodobě 16–24 hodin ve tmě při pokojové teplotě. Optimální poměr mezi hmotností rostlinného materiálu a objemem enzymatického roztoku je 1 g na 10 ml.

Dalšími důležitými látkami přidávanými do enzymatického roztoku jsou kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES) a osmotický stabilizátor. MES je organický pufr, který udržuje stálé pH v průběhu inkubace. A osmotické stabilizátory jsou látky zabraňující prasknutí cytoplazmatické membrány protoplastu. Přidávají se mimo jiné i do izolačních a kultivačních médií [6, 8].

1.4.3 Osmotický stabilizátor

Inkubací rostlinného materiálu v enzymatickém roztoku dochází vlivem enzymů k rozrušení buněčné stěny, která udržuje stálý tvar buňky. Vzniklým protoplastům schází mechanická opora, proto se do enzymatických roztoků, izolačních a kultivačních medií aplikují osmotické stabilizátory, které chrání protoplasty před popraskáním. Vhodnými zástupci jsou rozpustné organické látky, jako glukóza, fruktóza, galaktóza, sacharóza a nejvyužívanější sorbitol s mannitolem. Mannitol je upřednostňován při izolaci protoplastů z mezofylových buněk. V některých případech se protoplasty po provedení izolace přenášejí do kultivačního media obsahující metabolicky aktivní sacharidy (např. glukózu, sacharózu) spolu s metabolicky inertním mannitolem. Funkci osmotických stabilizátorů mohou plnit i anorganické soli, např. síran hořečnatý ($MgSO_4$), chlorid vápenatý ($CaCl_2$) a chlorid draselný (KCl). Protoplasty postupně metabolizují živiny z kultivačního media k vytvoření nové buněčné stěny. Po jejím obnovení a rozdělení protoplastů se koncentrace osmotického stabilizátoru zcela eliminuje [2, 14]. Ideální osmotický potenciál je v roztok udržován mezi 470 až 700 mOsm. Vyšší hodnota osmotického potenciálu zabraňuje popraskání protoplastů, zároveň může působit negativně a vést k inhibici jejich dělení. Hypotonické prostředí je z kvantitativního hlediska vhodnější oproti izotonickému [8].

1.4.4 Purifikace protoplastů

Úspěšná kultivace protoplastů je založena na odstranění nestrávených buněk, enzymatického roztoku a zničených protoplastů. Po inkubaci se enzymatický roztok se zbytky listů zfiltruje přes kovové sítko nebo nylonovou látku s velikostí pórů 50–100 μm . Filtrací se odstraní větší části nestrávených buněk. Další přečištění filtrátu od nežádoucích látek je zprostředkováno opakovanou centrifugací a resuspenzí v promývacím roztoku. Centrifugací se docílí sedimentace protoplastů, opakuje se většinou třikrát, po dobu 5–10 min, 75 x až 100 x g. Resuspenze se provádí v promývacím mediu obsahující osmotikum a soli. Kombinací centrifugace a resuspenze se získají čisté protoplasty, které jsou dále využity [6].

Pokud se izolují protoplasty z mezofylových buněk listů, součástí suspenze je velké množství rostlinného odpadu, proto se provádí flotace protoplastů v gradientu. Po filtraci a centrifugaci je sediment s protoplasty resuspendován v promývacím roztoku a následně převrstven 20% roztokem sacharózy a centrifugován. Na rozhraní promývacího

media a sacharózy se seskupí flotující protoplasty, které se odsají do centrifugační zkumavky s kultivačním médiem. Vápenaté kationty v promývacím roztoku stabilizují membránu protoplastů [8].

1.4.5 Životnost a hustota protoplastů

Dalšími předpoklady k úspěšné kultivaci je vysoká životnost a dostatečná hustota protoplastů. Životnost se vyhodnocuje několika metodami. První metodou je barvení fluorescein diacetátem (FDA). Zásobní roztok FDA v acetonu o koncentraci 0,5 % se skladuje při teplotě 0°C. Při testování životaschopnosti se zásobní roztok dávkuje k suspenzi protoplastů s finální koncentrací 0,01 %. Směs se nechá inkubovat asi 5 min., poté se vyhodnocuje životnost pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Živé buňky se barví zeleně, zatímco ty mrtvé červeně. Samotný FDA je nepolární látka, nevykazuje fluorescenci a volně prochází cytoplazmatickou membránou. V živých protoplastech se FDA metabolizuje esterázou za vzniku fluorescenční polární části fluoresceinu, která zeleně fluoreskuje pod mikroskopem.

K detekci životnosti se používá barvení Evansovou modří. Membrána mrtvých protoplastů propouští barvivo, lze pozorovat modré zbarvení. Živé protoplasty pigment přes membránu nepropouští, zůstávají nezbarvené [6]. Dalšími metodami jsou aplikace neutrálního červeného pigmentu (metabolicky aktivní buňky se barví červeně), sledování cytoplazmatického toku (znak aktivního metabolismu) a Calcofluor MR2 nebo Calcofluor white (obnovená buněčná stěna je detekována fluorescenčním mikroskopem).

Dělení buněk a formování mikrokalusu je závislé na množství protoplastů (10^4 – 10^6) v 1 ml media. Příliš vysoká hustota by způsobila spojování buněk v kolonie. Přesnou hustotu protoplastů je možné zjistit použitím hemocytometru, přibližnou hodnotu lze vypočítat pomocí Bürkerovy komůrky [8].

1.5 Kultivace protoplastů

Několik minut po zavedení protoplastů do kultivačního media se začíná regenerovat primární buněčná stěna, která prozatím není schopna odolávat turgorovému tlaku vyvíjenému cytoplazmou. Proto je žádoucí přítomnost osmotického stabilizátoru, který dočasně zastupuje funkci buněčné stěny. V některých případech je podmínkou pro udržení mitotického dělení postupné snižování osmotického tlaku ředěním kultivačního media roztokem s podobným složením, avšak s nižším osmotickým tlakem [5].

Protoplasty z různých druhů popřípadě stejného druhu, avšak izolované z odlišných pletiv mohou vykazovat rozdílné nutriční požadavky. Optimální složení media se stanoví pro každou kulturu individuálně provedením několika experimentů. Základem pro většinu medií jsou MS [12] a B5 [13] směsi (složení směsí – viz Tabulka 2), osmotikum a mannitol nebo rozpustnější sorbitol. Často se aplikují auxiny a cytokininy podporující růst protoplastů. Poměr mikroprvků a makroprvků je možné upravit podle požadavků rostliny [20].

Zásadní roli při kultivaci protoplastů sehrává složení kultivačního media, především obsah cukrů, které představují zdroj uhlíku, dále teplota a intenzita světla [8].

| MS medium | |
|--|---------------|
| Makroprvky | mg.l-1 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1900 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 440 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| | |
| Mikroprvky | mg.l-1 |
| KI | 0,83 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 22,3 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 8,6 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,025 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,025 |
| Na ₂ · EDTA | 37,3 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 27,8 |

| B5 medium | |
|--|---------------|
| makroprvky | mg.l-1 |
| KNO ₃ | 2500 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 150 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 250 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134 |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 150 |
| | |
| mikroprvky | mg.l-1 |
| KI | 0,75 |
| H ₃ BO ₃ | 3 |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 10 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 2 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,025 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,025 |
| Na ₂ · EDTA | 37,3 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 27,8 |

Tabulka 2: Složení MS a B5 směsí

1.5.1 Kultivační media

Protoplasty se kultivují v kapalných, polopevných a pevných médiích v Petriho miskách. Nejvhodnějším médiem pro kultivaci protoplastů je kapalné. Důvodem je snadnější průběh mitotického dělení, regulace osmotika, přijatelnější úprava hustoty buněk a výměna kultivačního media. I v případě optimálních kultivačních podmínek část protoplastů během 24 hodin degraduje [8]. Protoplasty některých druhů jsou kultivovány do vytvoření buněčné stěny v kapalném mediu, následně jsou přeneseny do agarového media [18]. Dále jsou uvedeny jednotlivé modifikace kultivace v kapalném mediu.

1. Liquid droplet method

Do Petriho misky se ze suspenze protoplastů a kultivačního media napipetuje 5–7 kapek (100–200 μl). Misky se uzavřou a nechají kultivovat. Mezi výhody této metody patří mikroskopické zkoumání protoplastů a dávkování čerstvého media do rozvíjející se suspenze v průběhu 5–7 dnů. Nevýhodou je riziko vytvoření jedné kapky, která vzniká slitím několika menších [18].

2. Hanging droplet method

Protoplastová suspenze (40–100 μl) se aplikuje na vnitřní stranu víka Petriho misky. Po uzavření misky jsou kapky zavěšené z víka směrem dolů. Oproti předešlé metodě, Hanging droplet method umožňuje v závislosti na jedné kapce kultivaci méně protoplastů [18].

3. Feeder layer

U metody Feeder layer se vyžaduje snížení hustoty protoplastů na minimum. Tenká vrstva ozářených, živých a nedělících se protoplastů je přenesena do Petriho misek s agarovým mediem. Metoda je důležitá pro selekci hybridních a mutantních buněk na agaru [18].

4. Co-culturing

Podstatou metody je smíchání rychle a pomalu rostoucích protoplastů v různém poměru. Rychle rostoucí protoplasty předávají růstové faktory a další látky, které usnadňují formování buněčné stěny a buněčné dělení [18].

1.5.2 Nutriční požadavky

Nepostradatelnými látkami kultivačních medií jsou dusičnan amonný a vápenaté kationty, které stimulují buněčné dělení. Koncentrace dusičnanu amonného ve většině kultivačních medií odpovídá 20 mmol/l, takové množství je pro protoplasty toxické. Proto je v případě kultivace protoplastů nutné snížit koncentraci soli na čtvrtinu až polovinu. U vápenatých kationtů je situace opačná, ve většině tkáňových kultur se koncentrace pohybuje od 0,5 do 3 mmol/l, ale pro buněčné dělení a regeneraci buněčné stěny je optimální hodnota 14 až 40 mmol/l. Příliš nízká koncentrace vápenatých kationtů v médiu by způsobovala shlukování a hnědnutí protoplastů. Běžná koncentrace dusičnanu

amonného (20 mmol/l) a vápenatých kationtů (0,5–3 mmol/l) se ustálí po vytvoření buněčné stěny [21].

Součástí kultivačních medií jsou nejen anorganické soli, ale také organické látky, jako mannitol, sorbitol, glukóza a sacharóza. První dva cukry (mannitol, sorbitol) plní funkci osmotického stabilizátoru a jejich koncentrace v mediu se pohybuje od 0,3 do 0,7 mol/l. Ve fázi viditelné makroskopické kolonie se jejich aplikace eliminuje. Glukóza a sacharóza představují pro protoplasty zdroj uhlíku. Tyto cukry je možné kombinovat v různých poměrech, nebo používat samostatně v koncentracích od 0,2 do 0,6 mol/l. Zatímco glukóza představuje univerzální zdroj pro všechny rostlinné druhy, sacharóza nemusí být pro některé protoplasty dostačující [18, 21].

Do kultivačních medií se často přidávají také kyselina nikotinová, kyselina listová, inositol, pyridoxin, glycin, thiamin a biotin. V malých množstvích (0,01–10 mg/l) se dávkuje kasein hydrolyzát, cholinchlorid, cystein, glutamin, riboflavin, adenin sulfát, kyselina jablečná a kyselina askorbová. Úkolem výše uvedených látek je urychlení regenerace buněčné stěny a buněčného dělení [21].

Kultivační media obsahují většinou auxiny a cytokininy, které podporují dělení a růst protoplastů [18]. V závislosti na druhu a způsobu regenerace se volí typ a koncentrace rostlinných hormonů. Mezi běžné auxiny patří kyselina naftalenoctová (NAA) a kyselina 2,4–dichlorfenoxycetová (2,4-D), koncentrace hormonů se pohybuje v rozmezí 0,45–10,7 $\mu\text{mol/l}$. Ze skupiny cytokininů se nejčastěji aplikují benzyladenin (BA) a zeatin v koncentracích 2 až 5 $\mu\text{mol/l}$. Uvedené cytokininy mohou být doprovázeny kinetinem nebo může být kinetin kombinován pouze s benzyladeninem, nebo zeatinem [21]. Výjimkou jsou například protoplasty *Arabidopsis thaliana*, které rostou rychleji v přítomnosti auxinů bez cytokininů [22].

1.5.3 Vnější podmínky při kultivaci protoplastů

Pokud by protoplasty na počátku kultivace byly vystaveny intenzivnímu světlu, mělo by to za následek zpomalení jejich růstu. Proto se počáteční fáze kultivace provádí ve tmě po dobu 2–10 dnů. V průběhu této doby se regeneruje buněčná stěna a protoplasty se začínají dělit. Následně mohou být protoplasty vystaveny přímému světlu mezi 2000 až 5000 lux [8]. Jsou známy studie, které potvrzují lepší růst protoplastů, pokud jsou kultivovány v nepřetržité tmě. Na druhou stranu např. luštěniny vyžadují pro zahájení dělení protoplastů světlo. Kultivace probíhá obecně při teplotách 20–28°C a pH kultivačního media se doporučuje v rozmezí 5,5–5,9 [18]

1.6 Regenerace rostlin z protoplastů

Regenerací se rozumí nejen syntéza nové buněčné stěny, ale zároveň i regenerace nové rostliny. Několik hodin po izolaci protoplastů dochází k syntéze nové buněčné stěny. Buněčná stěna je obnovena jeden až dva dny po izolaci, projevem její přítomnosti je ztráta sférického tvaru buněk. Některé protoplasty nemají schopnost regenerovat buněčnou stěnu, ztrácejí tím i schopnost mitózy. Naopak buňky podléhající dělení vytváří po 2–3 týdnech viditelné kolonie a následně se modifikuje kalus. Procentuální úspěšnost dělení protoplastů se pohybuje v rozmezí 0 až 80 %. Například v protoplastech izolovaných z hypokotylů brkev řepka (*Brassica napus*) byla prokázána po šesti denní kultivaci 20% úspěšnost dělení protoplastů. V průběhu několikátýdenní kultivace je pro optimální dělení protoplastů žádoucí upravovat složení kultivačního media, konkrétně obsah růstových regulátorů a osmotického stabilizátoru. Celý proces regenerace se dělí do 3 fází:

1. Iniciační fáze – v iniciační fázi dochází k tvorbě nových buněčných stěn, buňky podléhají prvnímu buněčnému dělení a vznikají viditelné kolonie a mikrokalusy. Kultivační medium obsahuje osmotický stabilizátor, růstové regulátory, cukry, soli a vitamíny.
2. Diferenciační fáze – v této fázi se aplikuje medium s vyšším obsahem cytokininů a nižším obsahem auxinů. Medium indukuje tvorbu stonků na kalusu.
3. Kořenová fáze – v závěrečné fázi vznikají na výhoncích kořeny a medium neobsahuje žádné růstové regulátory [8].

1.7 Uspořádání chromatinu a stresové podmínky při protoplastizaci

Do 60. let 20. století se využívaly pouze mechanické metody izolace protoplastů. Problémem uvedené metody byla neschopnost regenerace nové buněčné stěny a s tím související neschopnost další kultivace. U izolovaných protoplastů se studium omezovalo pouze na studium osmotických jevů. Po osvojení enzymatické degradace buněčné stěny rostlinných buněk bylo možné protoplasty dále kultivovat a při vhodných *in vitro* podmínkách regenerovat celé nové rostliny, mimo jiné uskutečňovat somatickou hybridizaci mezi protoplasty odlišných druhů a studovat buněčnou dediferenciaci. Vhodným příkladem dediferenciace je protoplastizace. Protoplasty izolované z mezofylových buněk listů mohou následnou kultivací v *in vitro* podmínkách zahájit buněčný cyklus a regenerovat kořeny nebo celou rostlinu. U rostlin jako je *Arabidopsis*,

tabák a okurka lze pozorovat při dediferenciaci protoplastů dekonduzaci heterochromatinu [39, 40].

Chromatin, jež je komplexem DNA a proteinů (histonů) lze rozdělit na vysoce kondenzovaný heterochromatin a méně kondenzovaný euchromatin. Odlišnosti mezi euchromatinem a heterochromatinem jsou v hustotě genů, obsahu repetitivní DNA, frekvenci meiotické rekombinace a času replikace. Dalšími rozdíly jsou v barvitelnosti, což již popsal Heitz v roce 1928. Euchromatin je slabě barvitelný, heterochromatin je intenzivně barvitelný a dělí se na konstitutivní fakultativní. Zatímco konstitutivní heterochromatin je trvale kondenzovaný ve všech buňkách, fakultativní heterochromatin je kondenzovaný pouze v určitém typu buněk (nejméně v embryonálních buňkách, nejvíce v diferencovaných buňkách) [41].

Při odstranění buněčné stěny z rostlinné buňky dekonduzuje chromatin, tento děj se projeví vymizením chromocenter z jádra. Během protoplastizace byly průtokovou cytometrií pozorovány dvě fáze dekonduzace chromatinu. První fáze probíhala v průběhu izolace po enzymatickém rozrušení buněčné stěny. Druhá fáze dekonduzace chromatinu nastala po aplikaci fytohormonů (cytokininy, auxiny) s izolovanými protoplasty ve vhodném množství a poměru. Následoval vstup buněk do S-fáze buněčného cyklu, proliferace a rediferenciace. Právě schopnost izolovaných protoplastů vstoupit opakovaně do buněčného cyklu může vést k regeneraci celé rostliny [39, 42].

Negativním důsledkem *in vitro* kultivovaných protoplastů je kumulace volných kyslíkatých radikálů. Dopad nežádoucích radikálů eliminují antioxidantní enzymy a antioxidanty, jako například askorbát, glutation, karotenoidy a fenolické látky. Právě oxidativní stres je častou příčinou neúspěšné kultivace, vedoucí až k buněčné smrti [43]. Nejvyšší koncentrace kyslíkatých radikálů je přítomna těsně po izolaci protoplastů a postupně během kultivace se snižuje. Také minimální aktivita antioxidantních enzymů (kataláza a peroxidáza) ovlivňuje odolnost protoplastů vůči stresorům. Přídavek vhodného množství kyseliny askorbové snižuje míru dekonduzace repetitivní DNA, snižuje koncentraci nežádoucích radikálů a zvyšuje produkci antioxidantních enzymů. Tyto vhodné podmínky napomáhají buňkám vstoupit opakovaně do buněčného cyklu a dělit se [44].

Pokud protoplasty odolají kyslíkatým radikálům, započne regenerace nové buněčné stěny. Poté následuje opětovný vstup protoplastů do buněčného cyklu, nejčastěji 48 hodin po izolaci, a částečné znovuvytvoření chromocenter [39]. Při buněčné dediferenciaci probíhají změny v genové expresi, ty jsou zásadní pro přechod z programu řídicího specifické funkce diferencovaných buněk k programu řídicímu vstup do S-fáze, proliferaci

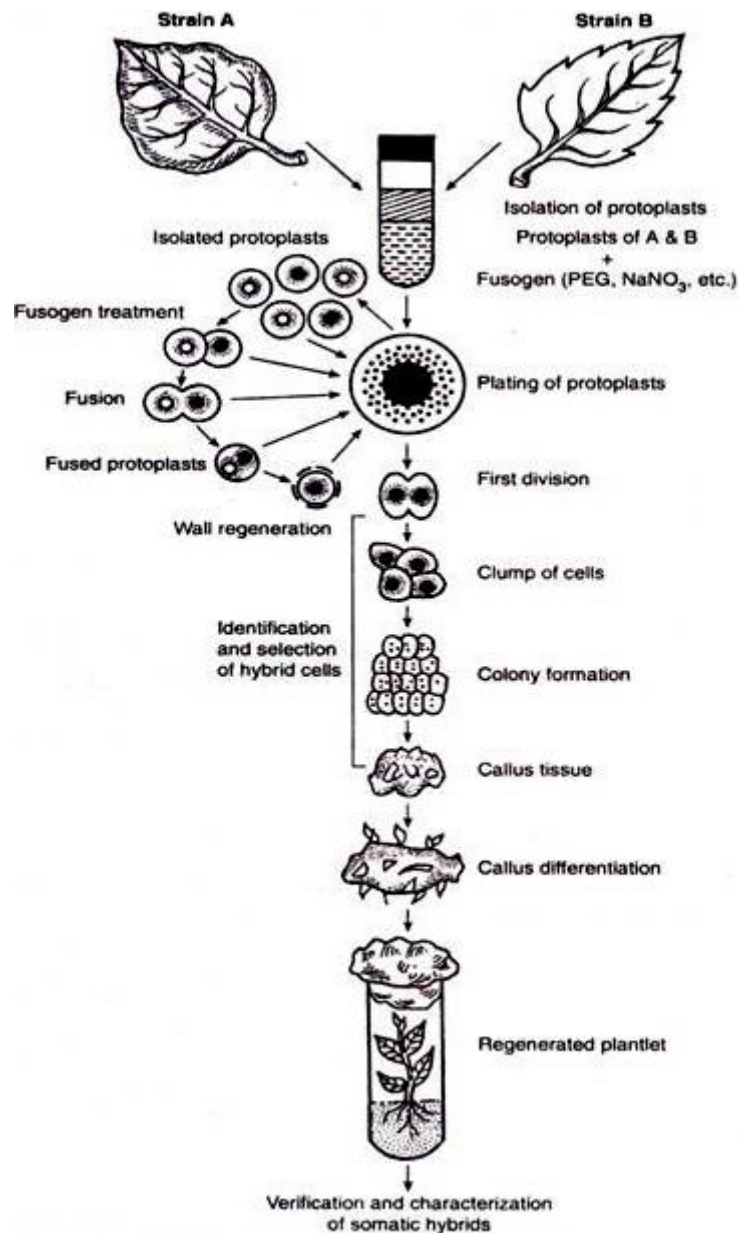
a rediferenciaci. První fáze chromatinové dekonkondenzace je pravděpodobně zásadní pro aktivaci genů. Aktivací vznikají proteinové produkty, které jsou schopné měnit buněčný osud [45].

Úspěšná kultivace probíhá, pokud:

1. se protoplasty vyrovnají s volnými kyslíkatými radikály
2. protoplasty regenerují buněčnou stěnu
3. vstoupí buňky opět do buněčného cyklu a syntetizují potřebné produkty
4. se buňky začnou dělit

1.8 Somatická hybridizace

K pohlavnímu křížení mezi příbuznými druhy se přistupuje již několik let. Cílem je získat šlechtěné rostliny s žádanými vlastnostmi. Nicméně mezi některými druhy v důsledku sexuální bariéry k pohlavnímu křížení nedochází. Tento problém byl překonán somatickou hybridizací. Podstatou je fúze protoplastů (somatických buněk) vedoucí ke kombinaci jaderné a cytoplazmatické genetické informace mezi vybranými druhy, popřípadě rody, které by nemohly vzniknout pohlavním křížením. Fúzí protoplastů bylo experimentálně docíleno přenosu, z volně rostoucích rostlin na důležité zemědělské plodiny, rezistentních genů vůči virovým a plísňovým onemocněním, odolných proti hmyzům škůdcům, odolných vůči stresu, syntetizující rezervní proteiny a vitaminy, nesoucí cytoplazmatickou samčí sterilitu a také genů tolerantních k chladu, suchu a slanosti. Podobně jako pohlavní křížení ani fúze protoplastů není možná mezi všemi druhy. V případě fúze protoplastů vzdálených taxonů je u vzniklého křížence reálný pokles viability a neúplná regenerace rostliny [8, 18]. Na Obrázku 3 je schéma znázorňující proces somatické hybridizace protoplastů ze dvou rodičovských rostlin odlišných genomů.

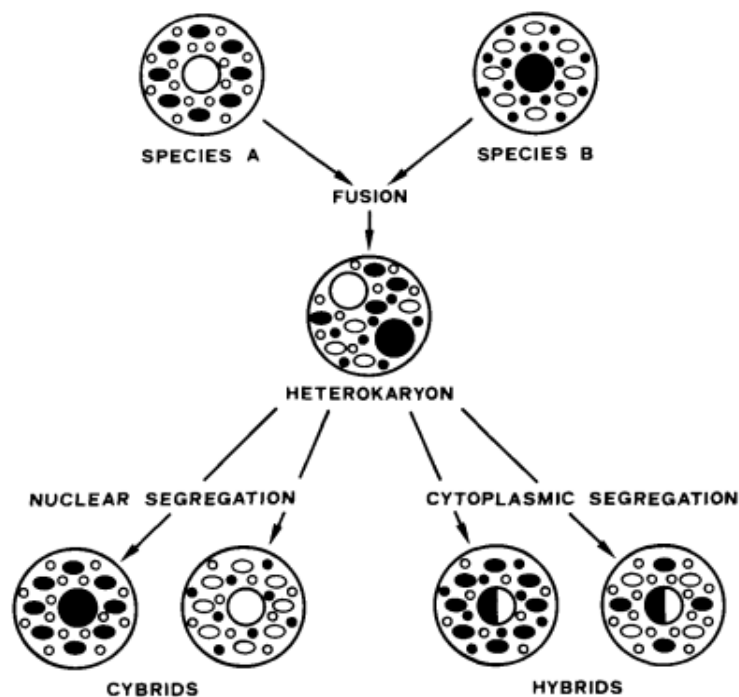


Obrázek 1: Somatická hybridizace

V jedné z počáteční fáze izolace je rostlinný vzorek macerován v enzymatickém roztoku. Promýváním vzorku se enzymatický roztok odstraní. Ve vzniklé suspenzi protoplastů a promývacího roztoku dochází k regeneraci nové buněčné stěny a po několika dnech se obnoví i buněčné dělení. Fúzi je proto nutné zahájit ihned po izolaci protoplastů, kdy je buněčná stěna eliminována. Úspěšnou fúzí vzniká směs heterokaryonových, homokaryonových a nefúzovaných mateřských protoplastů [8]. Fúzí protoplastů se shodnou jadernou genetickou informací vzniká homokaryon, naopak fúzí protoplastů s odlišnou jadernou genetickou informací vzniká heterokaryon. Heterokaryon je zásadní v dalším procesu hybridizace. Pokud vzniká hybrid s jadernými genomy obou mateřských

protoplastů, jedná se o symetrickou hybridizaci. Na rozdíl od asymetrické hybridizace, při které se jaderné a cytoplazmatické genomy různě kombinují. V některých případech u jednoho z mateřských protoplastů zcela vymizí genom, nicméně cytoplazmy mateřských protoplastů podléhají fúzi a vzniká tzv. cybrid (cytoplazmatický hybrid) [23]. Cytoplazmaticí hybridi se vyznačují několika výhodami. V jejich mitochondriálním genomu byla dokázána přítomnost genů způsobující rezistenci vůči některým patogenům, dále geny vyvolávající cytoplazmatickou samčí sterilitu (CMS). Rostliny s CMS nevytváří funkční tyčinky, pyl nebo samčí gamety. Takové rostliny nejsou schopny samoopylení, produkují hybridní semena, která jsou větší a vzniklá rostlina je vitálnější [24]. Celý proces somatické hybridizace zahrnuje následující fáze, izolaci protoplastů, fúzi protoplastů, regeneraci rostlin a analýzu regenerované rostliny. Fúze protoplastů může probíhat spontánně nebo indukovaně v přítomnosti fúzních látek [8, 18].

Na Obrázku 2 je schéma znázorňující vznik heterokaryonu somatickou hybridizací a následná diferenciace na cybridy a hybridy.



Obrázek 2: Vznik cybridů a hybridů

Spontánní fúze

V průběhu macerace protoplastů v enzymatickém roztoku se štěpí buněčná stěna. I přes její odstranění zůstávají protoplasty propojeny pomocí plasmodesmat, která umožňují fúzi sousedních protoplastů. Ke spontánním fúzím dochází pouze

vnitrodruhově a jedná se o nekontrolovanou fúzi dvou a více protoplastů. Tento proces probíhá jen výjimečně, důvodem jsou záporně nabitá náboje na povrchu protoplastů, které způsobují jejich vzájemné odpuzování [23].

Indukovaná fúze

Fúze může být indukovaná chemicky nebo elektrickým polem. Podstatou je destabilizace cytoplazmatické membrány z důvodu tvorby pórů a cytoplazmatických spojů mezi sousedními protoplasty. Při chemické fúzi se aplikuje fusogen, kterým může být dusičnan sodný, dusičnan vápenatý, polyvinylalkohol nebo polyethylenglykol (PEG), také je možné ošetření vápenatými solemi při vysokém pH v rozmezí hodnot 9–10,5. Výše uvedené faktory ovlivňují soudržnost cytoplazmatické membrány a usnadňují fúzi [8].

Pozitivním faktorem indukované fúze je vznik asymetrických hybridů, kteří vznikají inaktivací jádra jednoho z fúzovaného genotypu. Jádro lze inaktivovat rentgenovým nebo gama zářením [20].

1.8.1 Chemická fúze

V roce 1909 Kuster prokázal pozitivní vliv hypotonického roztoku dusičnanu sodného na fúzi protoplastů u plazmolyzovaných epidermálních buněk. Řízenou a reprodukovatelnou fúzi izolovaných protoplastů pomocí NaNO_3 popsal o několik desetiletí později Power et. al. (1970). V současné době se tato technika příliš nevyužívá, důvodem je nízká četnost tvorby heterokaryonů, především u vysoce vakuolizovaných mezofylových protoplastů.

Další metodou vyvolávající řízenou fúzi protoplastů je aplikace vápenatých roztoků s pH v alkalické oblasti. Tato skutečnost byla experimentálně potvrzena v roce 1973 Kellerem a Melchersem při fúzi protoplastů dvou linií tabáku v alkalickém 50mM roztoku dihydrátu chloridu vápenatého při $\text{pH}=10,5$, teplotě 37°C po dobu 30 min. Uvedená metoda se využívala především pro tvorbu somatických hybridů rodu *Nicotina*. U petunií tato metoda vykazovala ve srovnání s ostatními chemickými metodami nejvyšší úspěšnost. Vysoké pH některým druhům nepropívá, dokonce na ně působí toxicky.

Poslední uvedená metoda chemické fúze je v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG). Metoda vykazuje několik výhod, jsou jimi vysoká reprodukovatelnost tvorby vysokofrekvenčních heterokaryonů, tvorba vysokého podílu binukleárních heterokaryonů a nízká toxicita pro většinu typů buněk. Burges s Flemingem (1977) při experimentu porovnávali vliv alkalických roztoků obsahujících vápenaté kationty při 37°C

a polyetylenglykolu (PEG) na fúzi protoplastů. Aplikaci první uvedenou metodou vznikaly velké shluky s velkým počtem protoplastů, naopak využitím PEG docházelo většinou k agregaci mezi dvěma až třemi protoplasty. Stručný postup fúze protoplastů polyetylenglykolem je následující. Čerstvě izolované protoplasty ze dvou mateřských rostlin se smíchají ve vhodných poměrech a zpracují 15–45% roztokem polyetylenglykolu po dobu 15–30 min. Následně se suspenze s protoplasty promývá kultivačním médiem. Kao et al (1974) zjistili, že k vyšší frekvenci fúze dochází, pokud je suspenze s protoplasty promývána polyetylenglykolem a alkalickým roztokem vápenatých kationtů s pH přibližně 9–10 než samotným kultivačním médiem. Kombinace dvou výše uvedených metod je v současné době nejrozšířenější metodou fúze rostlinných protoplastů [6]. K fúzi protoplastů izolovaných z mezofylů je vhodnější použít PEG metodu na místo elektrofúze, při které mohou protoplasty praskat [8].

1.8.2 Elektrofúze

Fúze zprostředkovaná elektrickým polem se nazývá jako elektrofúze. K jejímu provedení je potřebných několik zařízení, jako zdroj stejnosměrného proudu, generátor impulsů, spínací jednotka pro aplikaci střídavých nebo přímých pulzů a nádoba vybavená elektrodami pro fúzi. Při elektrofúzi vznikají mezi elektrodami řetězce protoplastů. Výhodami této metody ve srovnání s chemickou fúzí jsou rychlost, jednoduché provedení a průběžná kontrola, synchronizace a vyloučení chemických látek. Úspěšná elektrofúze vyžaduje izolaci protoplastů vhodné kvality, rozumí se tím suspenze životaschopných protoplastů neobsahující buněčné zbytky. Další podmínkou je vzájemný kontakt protoplastů a vytvoření vhodného elektrického pulzního pole, které indukuje tvorbu dočasných pórů v plazmatické membráně. Póry v membráně vznikají následujícím způsobem. Membrána působí jako izolátor s vysokým elektrickým odporem. Pokud je membránou zvýšen rozdíl potenciálu, napětí membrány se destabilizuje a vznikne pór. Napětí se musí pohybovat v rozmezí 0,5–1,5 V, přesná hodnota se určí podle složení cytoplazmatické membrány a typu buněk. Také velikost protoplastů má vliv na fúzi, dle velikosti se volí intenzita pulzu. Přihlížet se musí i na délku pulzu. Použitím kratších impulsů vyššího napětí se zvýší životaschopnost a účinnost fúze, oproti delším pulzům s nižším napětím [8].

1.8.3 Mechanismus fúze

Základními principy fúze jsou přiblížení, adheze a spojení dvou různých typů protoplastů [8]. Fúze se dělí na tři etapy. V první dochází k aglutinaci, během které se plazmatické membrány dvou nebo více protoplastů dostanou do těsné blízkosti. Následuje membránová fúze, při které vznikají cytoplazmatická kontinua nebo můstky mezi protoplasty. Závěrečná etapa zahrnuje v důsledku expanze cytoplazmatických můstků zaokrouhlování fúzovaných protoplastů [6].

Fúzi znesnadňuje přítomnost záporných nábojů na povrchu protoplastů, ty se navzájem odpuzují a uskutečnění fúze je nereálné. Do těsného kontaktu se protoplasty dostanou mechanickým lisováním mikropipetou, odstředěním nebo přidávkem chemických látek. Chemickou látkou může být alkalický roztok dihydrátu chloridu vápenatého, který neutralizuje povrchové náboje. Protoplasty se mohou dostat do bezprostřední blízkosti a navzájem fúzovat. Jako další chemikálie se volí polyethylenglykol. Protoplasty s PEG ihned aglutinují a vznikají shluky dvou a více protoplastů. Mezi těsně uspořádanými plazmatickými membránami vznikají cytoplazmatické kanály. Tyto kanály se postupně rozšiřují a tvar fúzujících protoplastů připomínající činky se modifikuje do sférického modelu. Po vypláchnutí PEG se deplazmolyzují fúzní orgány a obnoví se aktivní proudění cytoplazmy. Tyto aktivity usnadňují zaokrouhlování fúzních protoplastů a promíchání cytoplazmy. Celý proces je ukončen po 3 až 10 hodinách [6, 8].

1.8.4 Výsledek fúze

Fúzující protoplasty dvou různých druhů mění ve vhodném kultivačním mediu po 2–3 dnech svůj tvar, důvodem je syntéza nové buněčné stěny. Dochází k mezidruhovému a vnitrodruhovému křížení, některé protoplasty fúzi nepodléhají. Žádoucí je vznik mezidruhových kříženců, poměr takové fúze se pohybuje mezi 0,5–10 %, záznamy uvádí i poměr 50 %. V počáteční fázi indukované fúze vzniká heterokaryon nebo heterokaryocyt, který obsahuje organely, protoplazmy i jádra obou mateřských druhů. Jaderným dělením vzniká z heterokaryonu (heterokaryocytu) hybridní buňka s jedním hybridním jádrem. Četnost mezidruhových hybridů je vyšší ve srovnání s vnitrodruhovými hybridy.

Hybridy je nutné rychle oddělit od nefúzovaných protoplastů. V opačném případě, ponecháním delší dobu produkt mezidruhových, vnitrodruhových hybridů a nefúzovaných protoplastů, by segregace mohla ovlivnit jaderné genomy, mitochondrie, plastidy

i cytoplazmatické organely [8]. Segregací plastidů nebo mitochondrií jednoho z mateřských druhů nebo kombinací chloroplastů od jednoho rodiče s mitochondriemi druhého rodiče vznikají hybridní buňky. Druhým případem je segregace jaderných genomů, vedoucí k postupné ztrátě chromozomů obvykle jednoho rodiče. Kombinací cytoplazmy obou rodičů a degenerací jednoho rodičovského jádra vznikají cytoplazmaticí hybridi (cybridi) s jaderným genomem jediného rodiče. Procesem somatické hybridizace nevznikají pouze hybridní a cybridi, mohou nastat i další situace. Jednou z nich je tvorba chimérické tkáně ze směsi geneticky odlišných buněk, pokud nastane časná segregace, následovaná proliferací obou dceřiných buněk. Dalším příkladem je vznik aloplazmatických buněk, které obsahují jádro jednoho rodiče s cytoplazmatickými organelami druhého rodiče [21].

1.8.5 Výběr hybridů

Závěrečným a zásadním krokem somatické hybridizace je vhodný výběr hybridních rostlin a jejich odlišení od rostlin s genetickou informací pouze jediného rodiče. Z důvodu kontroly rostlin probíhá kultivace ve sklenících. V některých případech mohou heterokaryonové buňky rychle růst a vytvářet viditelné, rychle rostoucí kolonie, které lze izolovat mechanicky a následně přenést do regeneračního media. Výběr vhodných fúzních produktů protoplastů probíhá dvěma způsoby:

1. Manuální selekce

Manuální selekce je velmi přesná a spolehlivá metoda pro produkci somatických hybridů, ale zároveň časově náročná. Selektce vhodných fúzních produktů protoplastů spočívá ve vizuální identifikaci a mechanické izolaci fixačních látek pomocí mikromanipulátorů. Fúzní produkty mohou být identifikované pod mikroskopem, pokud jsou fúzované protoplasty morfologicky odlišné nebo fluorescenčně aktivní. Fúzované produkty se identifikují fúzí mezofylových protoplastů, které jsou zelené a obsahují chloroplasty s bezbarvými protoplasty obsahující vakuoly nebo škrobová zrna. Pod mikroskopem jsou viditelné chloroplasty v jedné části buňky a vakuoly nebo škrobová zrna v jiné části. Následuje další fúze všech chloroplastů v buňce. Chloroplasty vytváří seskupení kolem jádra. Hybridní buňky se identifikují krátce po fúzi, delší kultivací (7–10 dní) ve tmě ztrácí chloroplasty zbarvení a vypadají totožně jako bezbarvé plastidy.

Pokrok u této metody byl zaznamenán objevem duálního fluorescenčního značení heterokaryonů. Zelené protoplasty ošetřené fluorescein diacetátem fúzují s protoplasty

emitující červenou fluorescenci, která je způsobena autofluorescencí chlorofylu nebo aplikovaným rhodaminem isothiokyanátu [8].

2. Průtoková cytometrie

Metoda je plně automatizovaná a rychlá. Umožňuje účinné a rychlé oddělení vysokého počtu fúzovaných protoplastů od nefúzovaných. Využívá se pro automatickou izolaci heterokaryonů. Principem metody je dvojité fluorescenční barvení a selekce protoplastů, zatímco proudí kapilárou průtokového cytometru. Směs protoplastů proudí mezi světelným zdrojem a fluorescenčním detektorem. Tok je rozptýlen do kapiček a na základě elektrostatického pole jsou kapičky s heterokaryony odraženy do jednotlivých zkumavek [8].

1.8.6 Identifikace hybridů

Hybridní rostliny lze identifikovat morfologicky, cytologicky a biochemicky. Somatictí hybridi se obvykle podobají oběma mateřským rostlinám. Hodnotí se znaky, jako tvar, velikost, barva listů a květů. Dále hustota a rozmístění trichomů na listech, popřípadě jejich absence. Obvykle somatický hybrid, vzniklý pohlavním křížením, obsahuje znaky obou mateřských rostlin. Experimentálně byly pozorovány morfologické znaky (tvar listů, velikost řapíku, hustota trichomů, tvar, velikost a barva květu) u mezidruhového hybridu tabáku *Nicotiana tabacum* a *Nicotiana glauca*. Všechny zaznamenané znaky u hybridu se vyskytovaly u mateřských rostlin. V některých případech se konkrétní znak jedné mateřské rostliny chová jako dominantní, to je důvodem jeho výskytu u všech hybridů. Dalšími pozorovanými znaky jsou životaschopnost pylu a počet chromozomů. Pyl somatického hybridu, vzniklého z druhově vzdálených taxonů, vykazuje nižší životaschopnost ve srovnání s mateřskými rostlinami. Počet chromozomů se může rovnat součtu chromozomů obou rodičů, nebo se může lišit, ovlivňuje to asymetrická hybridizace, fragmentace i polyploidizace. Mikroskopováním lze určit hybridu na základě detekce dvou typů chromozomů, lišících se velikostí. Odlišné chromozomy jsou viditelné v metafázi buněčného dělení [5].

Biochemická identifikace zahrnuje izoenzymovou analýzu, analýzu parciálních proteinů, sekundárních metabolitů, rezistenci rostlin vůči virovým infekcím a antibiotikům nebo citlivost na herbicidy a fungicidní toxiny [8]. Jednou z nejspolehlivějších identifikačních metod je izoenzymová analýza, založená na pohyblivosti izoenzymů v gelu

během elektroforézy. Izoenzymy jsou proteiny a navzájem se liší primární strukturou, z toho vyplívá jejich rozdílná pohyblivost v elektrickém poli. Izoenzymy se získávají z rostlin extrakcí, následně se homogenizují extrakčním pufrem, centrifugují a izolují. Izolované izoenzymy se aplikují do gelu, při zapojení ke zdroji napětí vzniká elektrické pole a izoenzymy se pohybují od katody k anodě. Vznikají specifické pásy pro každý izoenzym, které se detekují v agarózové vrstvě obsahující substrát. Reakcí substrátu s izoenzymem se obarví tzv. pattern proužků. Vzniká zymogram s zónami enzymatické aktivity izoenzymů [6, 7].

Genetická analýza se provádí u hybridních rostlin schopných reprodukce. S rostoucí mezidruhovou vzdáleností taxonů vzrůstá u hybridů sterilita. Zatímco moderní molekulární technologie RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) a RAPD (náhodná amplifikace polymorfní DNA) se využívají ke srovnání genotypů, průtokovou cytometrií se analýzou DNA stanoví ploidie [8].

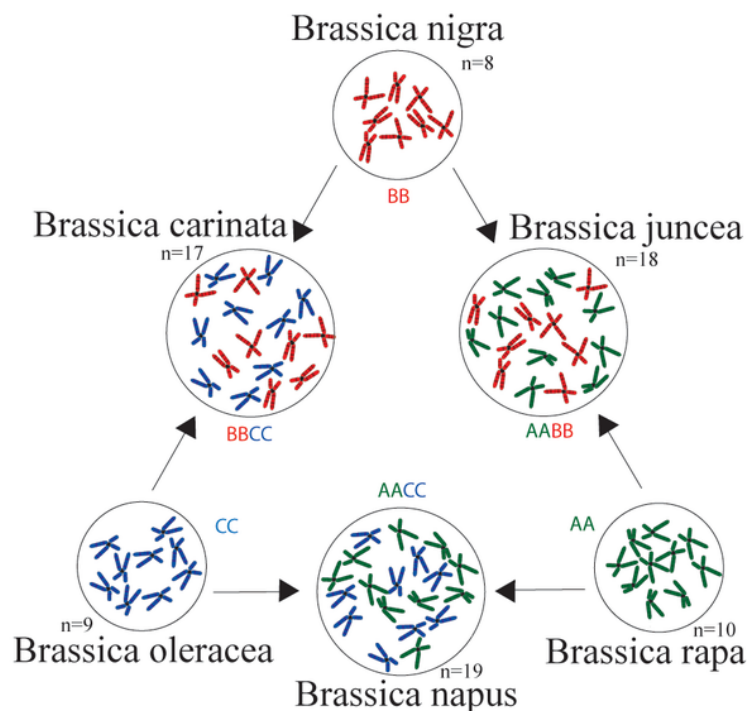
1.9 Genom brukvovité (*Brassicaceae*)

Za původního předka čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) je považována brukev zelná (*Brassica oleracea*) [22]. Významnými druhy jsou zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata*), kapusta hlávková (*Brassica oleracea* var. *sabauda*), kapusta růžičková (*Brassica oleracea* convar. *gemmifera*), kadeřávek (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*) a kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). Druhy se mohou vzájemně křížit a vytvářet přechodné formy. V roce 1924 Karpenkoe křížil dva taxonomicky vzdálené druhy – zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*) a ředkvičku (*Raphanus sativus*), výměnou genetické informace vznikl hybrid *Raphanobrassica*. Hybrid byl vhodný jako krmivo a hnojivo [8].

Dalším významným zástupcem je houseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), který se využívá jako modelová rostlina v molekulární genetice. Zásluhou vědců se jedná o první rostlinu, jejíž genom byl kompletně sekvenován. U druhů rodu *Brassica* proběhla triplikace celého genomu. Jednotlivé genomy se označují písmeny A, B, C a byly odvozeny od allohexaploidního předka [23]. Rozeznávají se tři diploidní druhy *Brassica rapa*, $n = 10$, AA; *Brassica nigra*, $n = 8$, BB; *Brassica oleracea*, $n = 9$, CC; dále tři amfiploidní druhy *Brassica juncea*, $n = 18$, AABB; *Brassica napus*, $n = 19$, AACC; *Brassica carinata*, $n = 17$, BBCC a tři monogenomické diploidní druhy *Brassica rapa* syn. *campestris*, $2n = 20$, AA; *Brassica nigra*, $2n = 16$, BB a *Brassica oleracea*, $2n = 18$, CC. Studie dokazují, že hybridizací *Brassica rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) s *Brassica oleracea*

($2n = 2x = 18$, CC) dochází ke zdvojení chromozomů a vzniká tak aloploidní potomstvo. V tomto případě vznikla *Brassica napus* ($2n = 4x = 38$, AACCC). Dále hybridizací monogenomických diploidních druhů vznikly *Brassica carinata* A. Braun a *Brassica juncea* [31].

K porozumění vzájemných vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Brassica* vytvořil japonský botanik Woo Jang-Choon teorii, kterou pojmenoval - Trojúhelník U. Teorie potvrzuje křížení mezi druhy rodu *Brassica*. Základem je trojúhelník, ve vrcholech jsou umístěny tři diploidní druhy - *Brassica nigra*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* s genomy A, B a C. Ve středu hran trojúhelníku jsou umístěni hybridy, kteří vznikli křížením původních genomů A, B, C. Jsou jimi tři allopolyploidi *Brassica juncea* (AABB), *Brassica napus* (AACCC) a *Brassica carinata* A. Braun (BBCC) [24]. U kultivovaných poddruhů druhu *Brassica oleracea* jsou patrné výrazné odlišnosti v morfologii, je to dáno výsledkem selekce k různému využití v průběhu domestikace rostlin [25]. Schéma znázorňující genetické vztahy mezi šesti druhy rodu *Brassica* viz Obrázek 3.



Obrázek 3: Trojúhelník U

2 MATERIÁL A METODY

Semena *Brassica oleracea var. botrytis* (odrůdy Beta, Bora, Igloo, Poranek, Snowball X, Octavian; Seva Moravia s.r.o., Valtice, Česká republika)

Chemikálie:

Promývací roztok W5: 0,11 g glukóza monohydrát; 0,9 g chlorid sodný; 0,08 g chlorid draselný; 2,44 g dihydrát chloridu vápenatého; 0,039 g kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES); 100 ml destilovaná voda; sterilizováno filtrací

Enzymatický roztok: 1 g celuláza Onozuka R-10; 0,1 g 0,1 g pektináza Y-23; 0,39 g kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES); 0,074 ; dihydrát chloridu vápenatého; 5,47 g mannitol; 100 ml destilovaná voda; sterilizováno filtrací

Kultivační roztok CPP: 16,3 g glukóza monohydrát; 0,05 g kasein; 0,1 mg.l⁻¹ kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D); 0,2 mg.l⁻¹ kinetin; 0,72 g Gamborg B5 medium; 200 µl Kao and Michayluk medium; 200 ml destilovaná voda; sterilizováno filtrací

OK medium: 4,405 g Murashige a Skoog medium; 10 g sacharóza; 20 mg kyselina askorbová; 8 g agar; 0,01 mg kyselina indol-3-máselná (IBA); 0,01 mg 6-benzylaminopurin (BAP); 400 mg.l⁻¹ ampicilin; 100 mg.l⁻¹ chloramfenikol; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním

Sacharóza: 17,1 g sacharóza; 2 mg kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES); 100 ml destilovaná voda; sterilizování filtrací

2.1 Pěstování rostlin

Nenarušená semena rodu *Brassica* (Beta, Bora, Igloo, Poranek, Snowball X, Octavian) byla opláchnuta v 70% roztoku etanolu po dobu 1 min a vysterilizována v 36% roztoku Sava po dobu 12 min, nakonec byla pětkrát promyta destilovanou vodou. Semena byla přenesena do Petriho misek na MS medium a umístěna do fytotronu.

2.2 Izolace protoplastů

Mladé lístky byly odříznuty sterilním skalpelem a přeneseny sterilní pinzetou do Petriho misky s enzymatickým roztokem. Lístky byly rozřezány na přibližně 1 mm velké proužky. Suspenze byla ponechána v termostatu vyhřívaném na 25°C po dobu 16 hod. Po uplynulé době byla suspenze přefiltrována přes sítko (uhelon 72 µm), filtrát byl Pasteurovou pipetou přenesen do centrifugační zkumavky. Objem byl doplněn na 10 ml promývacím roztokem W5. Zkumavky byly centrifugovány při 1000 otáček/min po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml roztoku sacharózy. Vzniklý roztok byl převrstven 2 ml roztoku W5 za vzniku emulze. Následovalo centrifugování zkumavek 1200 otáček/min po dobu 10 min. Na rozhraní sacharosy a promývacího roztoku se seskupily flotující protoplasty, které byly přeneseny Pasteurovou pipetou do čistých centrifugačních zkumavek. Objem v jednotlivých zkumavkách byl sjednocen přidáním promývacího roztoku a zkumavky byly centrifugovány při 1000 otáček/min po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 1 ml kultivačního roztoku. Následovalo stanovení hustoty a životnosti protoplastů.

2.3 Hustota a životnost protoplastů

Hustota byla stanovena využitím Burkerovy počítací komůrky se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou. Počítací síť je rozdělena trojitými čarami na 9 velkých čtverců a dvojitými čarami na 144 středních čtverců. Suspenze protoplastů a kultivačního media byla aplikována mezi podložní a krycí skličko. Připravená Burkerova počítací komůrka byla vložena do zorného pole světelného mikroskopu. Zaznamenávaly se hodnoty protoplastů v deseti středních čtvercích. Počítaly se protoplasty umístěné ve čtverci a ty, které se z vnější nebo vnitřní strany dotýkají dvou stanovených stran. Pro stanovení koncentrace protoplastů v 1 ml suspenze se dosazují hodnoty každého vzorku do vztahu $P = \frac{p.v.h.z}{y}$. Výsledná hustota suspenze byla upravena na hodnotu mezi $1-2 \cdot 10^5$ protoplastů v 1 ml.

P: celkový počet protoplastů v 1 mm^3

p: počet počítaných protoplastů

v: převrácená hodnota plochy jednoho políčka, ve kterém jsou protoplasty počítány

h: převrácená hodnota hloubky komůrky

z: ředění vzorku

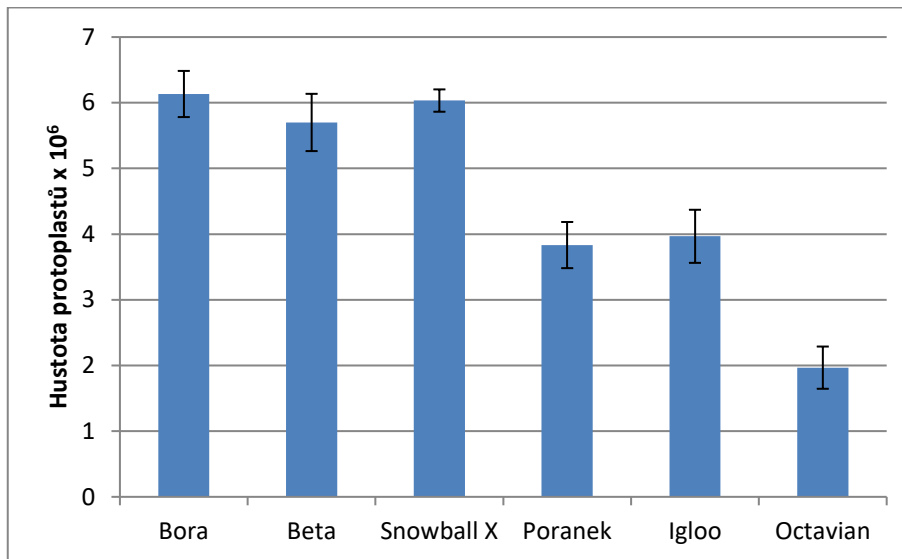
y: počet počítaných středních čtverců (10)

Životnost byla zjištěna na základě použití fluorescein diacetátu (FDA). Zásobní roztok (5 mg fluorescein diacetátu + 1 ml acetonu) o objemu 0,02 ml byl smíchán s 1 ml promývacího roztoku (pracovní roztok). Kapka suspenze s protoplasty nanesená na podložní sklo byla smíchána s 0,02 ml pracovního roztoku. Po 1 až 2 minutách byla suspenze přikryta krycím sklíčkem a životnost pozorována fluorescenčním mikroskopem (hranol WB). Živé buňky se barvily zeleně, mrtvé buňky červeně.

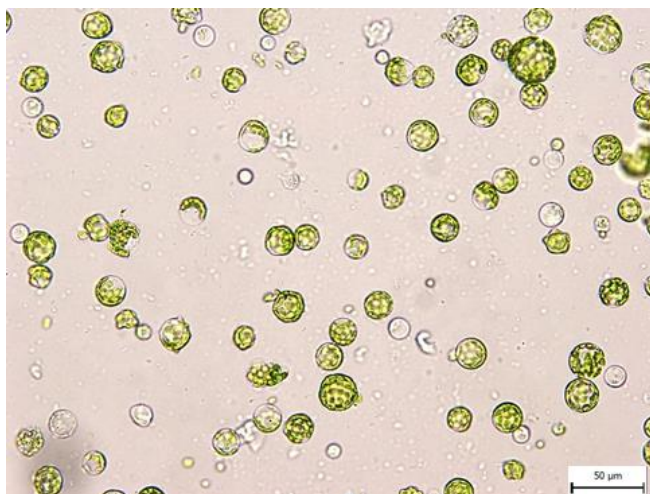
3 PRAKTICKÁ ČÁST S VÝSLEDKY

Hustota

Po úspěšné izolaci protoplastů následovalo určení jejich hustoty pomocí Bürkerovy komůrky. Hustota protoplastů *Brassica oleracea* var. *botrytis* byla pozorována u odrůd - Bora, Beta, Snowball X, Poranek, Igloo a Octavian. Měřeny byly celkem tři série každé odrůdy (1 série = 10 čtvercových polí). Nejvyšší hustota protoplastů v 1 ml suspenze byla pozorována u odrůdy Bora ($6,5 \cdot 10^6$), nejnižší u odrůdy Octavian ($2,2 \cdot 10^6$). V grafu je na svislé ose vynesena průměrná hustota protoplastů v 1 ml suspenze ze tří sérií měření, na vodorovné ose je výčet odrůd květáku. Součástí grafu jsou směrodatné odchylky.



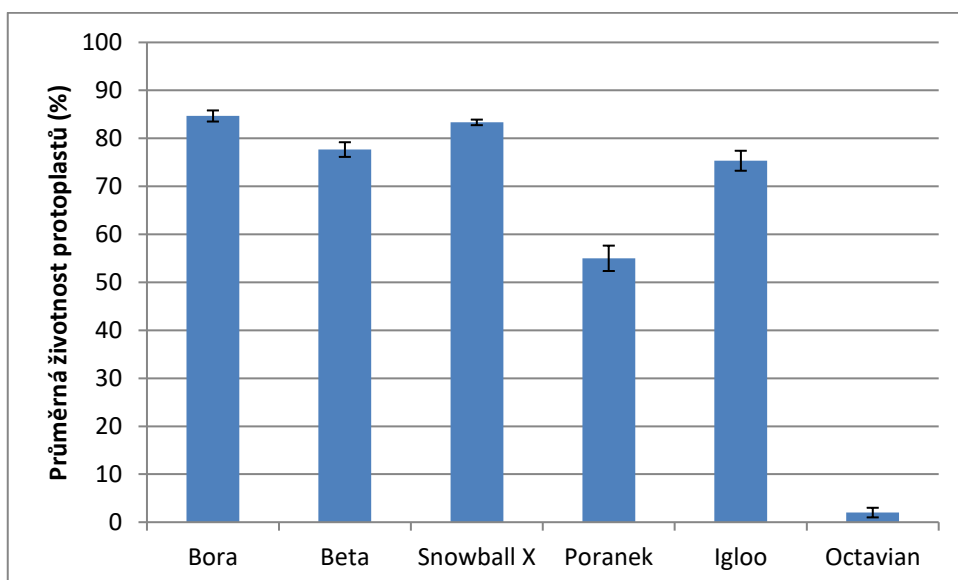
Obrázek 4: Graf hustoty protoplastů



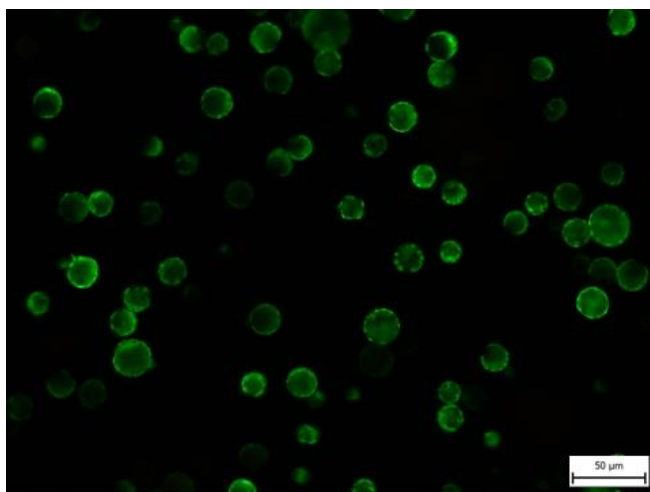
Obrázek 5: Izolované protoplasty, odrůda Bora

Životnost

Po výpočtu hustoty se smíchala suspenze protoplastů s FDA a byla určena životnost. Životnost protoplastů *Brassica oleracea* var. *botrytis* byla pozorována u následujících odrůd Bora, Beta, Snowball X, Poranek, Igloo a Octavian. Vyhodnoceny byly celkem tři série každé odrůdy (1 série = 10 zorných polí). Nejvyšší životnost byla zaznamenána u odrůdy Bora (86 %), hranici 80 % dále překročila odrůda Snowball X, naopak nejnižší životnost byla pozorována u odrůdy Octavian 2 %. V grafu je na svislé ose vynesena průměrná životnost protoplastů ze tří sérií měření, na vodorovné ose je výčet odrůd květáku. Na Obrázku 6 jsou protoplasty barvené FDA. Součástí grafu jsou směrodatné odchylky.



Obrázek 6: Životnost protoplastů



Obrázek 7: Životnost protoplastů, barvení FDA, odrůda Bora

4 DISKUZE

Optimalizací řady faktorů, kterými jsou izolační postupy, hustota protoplastů, složení kultivačního media, koncentrace růstových regulátorů a fotoperioda v počáteční fázi kultivace je možné získat protoplasty s vysokou schopností regenerace v nové rostliny [32]. Až do konce 70. let 20. století se nedařilo regenerovat rostliny rodu *Brassica* z protoplastů. Ve většině případů byly pozorovány pouze kalusy nebo diferenciované kořeny [33]. V současné době je možné u *Brassica* izolovat protoplasty z kotyledonů [34], hypokotylů, kořenů a listů [32].

V experimentech byly protoplasty izolované z listových mezofylů *Brassica oleracea* var. *botrytis*, odrůd: Beta, Bora, Igloo, Snowball X, Poranek, Octavian. Semena byla sterilizována 1 min. v 70% ethanolu, dále 12 min. v 36% komerčním prostředku Savo a poté následovalo promývání semen v destilované vodě (5 krát). Semena byla naklíčena na OK mediu. V literatuře je k dohledání nepřeborné množství podobných i zcela odlišných postupů sterilizace. Například Xu, Davey a Coocking (1981) sterilizovali semena *Brassica alba*, *Brassica campestris*, *Brassica oleracea* a *Brassica napus* v agaru obsahujícím chlorid rtuťnatý a sacharózu [35]. Lu, Pental a Coocking (1982) sterilizovali semena *Hyoscyamus niger* a *Nicotiana tabacum* v 20% bělícím prostředku Domestos po dobu 30 min. Dále semena *Brassica oleracea*, *Brassica napus* a *Medicago sativa* byla sterilizována chloridem rtuťnatým a laurethsulfátem sodným po dobu 10 min a následovalo promývání v destilované vodě [36]. Sterilizační podmínky si upravila i Glimelius (1984), semena *Brassica napus*, *Brassica campestris* a *Brassica oleracea* byla protřepávána hodinu s chlornanem vápenatým, vzápětí promyta destilovanou vodou [37].

Protoplasty byly izolované z 5 týdnů starých *in vitro* rostoucích rostlin. Listy byly nařezány na malé kousky a macerovány 16 hod. v enzymatickém roztoku, obsahujícím celulózu Onozuka R-10, pektinázu Y-23, MES, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a mannitol. Izolované protoplasty byly resuspendovány v kultivačním roztoku a připravené k určení hustoty a životnosti. Kaur a kol. (2006) izolovali protoplasty z listových mezofylů *Brassica oleracea* var. *botrytis* a *Brassica napus*. Zjistili, že protoplasty izolované po 10-12 hod. macerace v enzymatickém roztoku vykazovaly vyšší životnost než protoplasty izolované během 16-18 hod. Složení enzymatických a kultivačních roztoků se stanovují individuálně u každého experimentu dle rostlinného materiálu [32].

V experimentech byla sledována hustota a životnost protoplastů u *Brassica oleracea* var. *botrytis*, odrůd: Beta, Bora, Igloo, Snowball X, Poranek, Octavian.

Mezofylové protoplasty byly izolovány z 5 týdnů starých listů *in vitro* rostoucích rostlin. Odrůdy Octavian a Igloo vykazovaly ve srovnání s ostatními odrůdami největší morfologické rozdíly. Listy uvedených dvou odrůd byly velké a světle zelené. Odrůdy Beta, Bora, Snowball X a Poranek tvořily malé, sytě zelené listy. U Igloo bylo pozorováno, oproti ostatním odrůdám, pozdní klíčení semen a nejnižší klíčivost vůbec. Rozdíly byly zřejmé i při porovnání hustoty protoplastů v 1 ml suspenze a jejich životnosti. Nejvyšší hustota všech tří měření byla vypočítána u Bora, následoval Snowball X, Beta, Poranek, Igloo a výrazně nejnižší hustota u odrůdy Octavian. Životnost přesahující 80% hranici byla zaznamenána u Bora a Snowball X. Vysoká životnost přes 70 % u odrůdy Beta a Igloo, 50% životnost u Poranek a nejnižší životnost, pouze okolo 2 % u odrůdy Octavian. Mikrokalusy byly pozorovány 12. den od izolace u Bora a Beta. Poté byla kultivace přerušena. I přes vysokou životnost u Snowball X (více než 80 %), Igloo (více než 70 %) a Poranek (více než 50 %) nebylo u odrůd zaznamenáno dělení. Octavian s velmi nízkou hustotou a téměř nulovou životností taktéž nevykazoval dělicí schopnosti. Uvedené výsledky podporují souvislost mezi genotypem a úspěšností izolace, konkrétně hustotou, životností a regenerací protoplastů.

Vazbu mezi genotypem a úspěšnou izolací, kultivací a regenerací potvrzují i následující studie. Hu, Andersen a Hansen (1999) analyzovali 36 genotypů druhu *Brassica* (*Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea* a tři vzdálené druhy). Výsledky potvrdily vliv genotypu na schopnost regenerace nové rostliny. Oba genotypy *Brassica juncea* regenerovaly v nové rostliny. U *Brassica napus* byla pozorována významnější variabilita. Nové rostliny regenerovaly u 9 genotypů s odlišnou regenerační účinností, u zbývajících genotypů byla regenerace neúspěšná. U žádného z devíti genotypů *Brassica rapa* nebyla regenerace rostliny úspěšná. U tří vzdálených druhů se regenerační účinnost pohybovala od 0 % po 100 % [46]. Regenerační účinnost ovlivňuje u druhů *Brassica* řada faktorů, nejen genotyp, ale například i kombinace růstových hormonů v mediu. Tuto skutečnost potvrdili Jain a kol. (1988) [47].

Při klíčení semen byla u tří sérií zaznamenána vnitřní kontaminace a izolace protoplastů byla zcela znemožněna. Z tohoto důvodu se přistoupilo na aplikaci chroamfenikolu a ampicilinu do živného OK media. Negativní vliv antibiotik na regeneraci rostlin z protoplastů potvrzuje T. H. Ulrich, J. B. Chowdhury a J. M. Widholm (1980), kteří izolovali protoplasty z listových mezofylů *Brassica rapa*. Zatímco protoplasty resuspendované v kultivačním mediu 8p vytvářely po 14 dnech od izolace kalusy.

Protoplasty resuspendované v kultivačním mediu s antibiotiky přežily maximálně 6 dní, udržovaly stálý sférický tvar bez schopnosti dělení [38].

5 DIDAKTICKÁ ANALÝZA A ZPRACOVÁNÍ TÉMATU

5.1 Přírodopis a biologie v Rámcovém vzdělávacím programu (RVP)

Kurikulární dokumenty jsou vytvářeny na státní a školní úrovni. Státní úroveň zastupují Národní program vzdělávání (NPV) a rámcové vzdělávací programy (RVP). První uvedené kurikulum definuje vzdělávání jako celek. Na druhou stranu rámcové vzdělávací programy vymezují jednotlivé rámce vzdělávání, kterými jsou předškolní, základní a střední vzdělávání. Rozsah učiva si každá škola volí individuálně. Sestavují si tzv. školní vzdělávací program (ŠVP), který reprezentuje školní úroveň kurikulárních dokumentů. Jednou ze základních podmínek při sestavování ŠVP je dodržení zásad uvedených v příslušném RVP [26].

Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání (RVP ZV) je platný nejen pro základní školy, ale také pro nižší stupeň víceletých gymnázií. Každý vyučovaný předmět je v RVP ZV součástí tzv. vzdělávací oblasti. Konkrétně přírodopis spadá společně s fyzikou, chemií a geografii do oblasti Člověk a příroda. Žáci se s přírodopisem poprvé setkávají na druhém stupni, dle RVP se dále člení na obecnou biologii a genetiku, biologii hub, biologii rostlin, biologii živočichů, biologii člověka, neživou přírodu, základy ekologie a praktické poznávání přírody. Didaktické hry inspirované tématem diplomové práce by bylo vhodné začlenit v úvodních vyučovacích hodinách biologie rostlin [27].

Struktura Rámcového vzdělávacího programu pro gymnázia je totožná s RVP ZV. Součástí vzdělávací oblasti Člověk a příroda je stále fyzika, chemie, zeměpis a přírodopis je nahrazen slovem biologie. Obsah biologie gymnaziálního studia zahrnuje obecnou biologii, biologii virů, biologii bakterií, biologii protist, biologii hub, biologii rostlin, biologii živočichů, biologii člověka, genetiku a ekologii. Didaktické materiály vycházející z tématu diplomové práce jsou vypracované formou pracovního listu, který lze začlenit do výuky obecné biologie, při řešení problematiky prokaryotní a eukaryotní buňky [26].

5.2 Didaktické hry

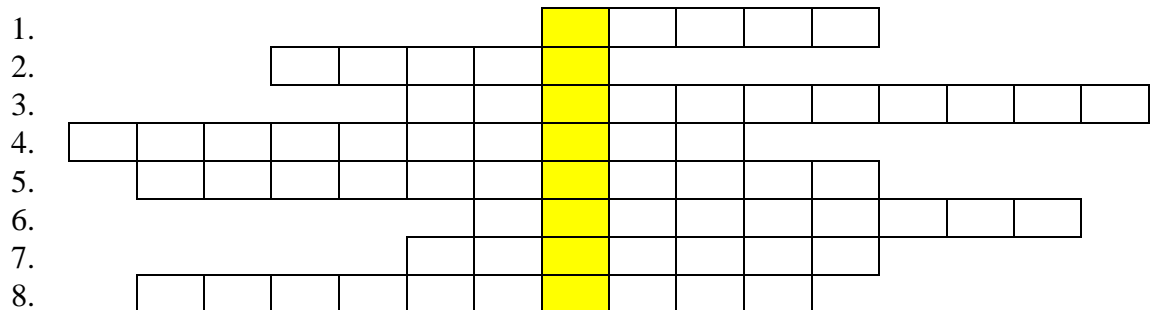
Na základních školách a gymnáziích se obvykle využívá jako povinná studijní literatura učebnice se schvalovací doložkou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT). Doložka je zárukou splněných cílů vzdělávání stanovených školským zákonem, právními předpisy a vzdělávacími programy. Seznam všech učebnic s platnou doložkou lze dohledat na webových stránkách msmt.cz [28]. Platnost doložky je kontrolována každých 6 let, po uplynutí této doby nastává přezkoumání učebnic a prodloužení, popřípadě neprodloužení její platnosti. Pokud nastane druhá situace, musí být ředitel školy obeznámen s tímto faktem a dle vlastního uvážení může rozhodnout o koupi nových učebnic přírodopisu/biologie s platnou doložkou nebo využívat nadále původní učebnice bez platné doložky. Z výše uvedeného vyplývá, že mohou být na školách využívány jako povinná studijní literatura i učebnice bez schvalovací doložky, pokud splňuje cíle vzdělávání stanovené školským zákonem, rámcovými vzdělávacími programy a pokud splňuje didaktické a pedagogické zásady.

Při sestavování didaktických her pro základní školy a nižší stupeň víceletých gymnázií byly čerpány informace z učebnice přírodopisu s platnou doložkou MŠMT – Přírodopis pro základní školy a víceletá gymnázia, Fraus [29]. V učebnici nejsou uvedeny žádné informace o protoplastech. Pro zařazení tématu diplomové práce do výuky přírodopisu se vycházelo z faktu, že protoplasty jsou rostlinné buňky zbavené buněčné stěny. Z tohoto důvodu jsou didaktické hry zaměřeny na eukaryotní buňky – rostlinné a živočišné – jejich stavbu a funkci organel. Cílem didaktických her je opakování a upevnění učiva, byly vypracovány křížovka, spojování organela – funkce, rozhodni o ne/pravdě výroku.

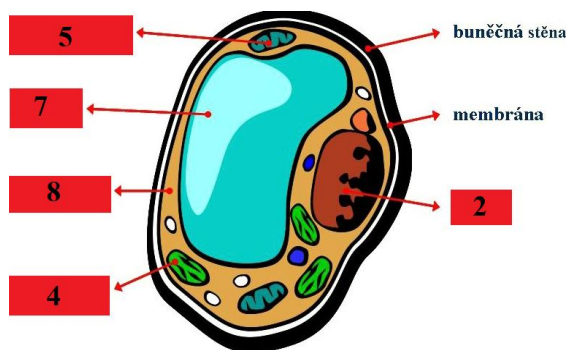
Pracovní list pro gymnaziální žáky se soustředí na učivo buňky (prokaryotní, eukaryotní) a osmotických jevů. Informace byly čerpány z učebnice Obecná biologie pro gymnázia [30] s platnou schvalovací doložkou MŠMT. V učebnici se vyskytuje pojem protoplasty. Pracovní list může být využit k závěrečnému opakování problematiky, popřípadě jako test.

5.2.1 Didaktické hry pro základní školy a nižší stupeň víceletých gymnázií

Křížovka



1. je základní stavební a funkční jednotka každého živého organismu.
2. Pojmenuj organelu na obrázku níže.
3. Název procesu, při kterém se oxid uhličitý mění pomocí slunečního záření na cukry.
4. Pojmenuj organelu na obrázku níže.
5. Pojmenuj organelu na obrázku níže.
6. Eukaryotické buňky se dělí na rostlinné a
7. Pojmenuj organelu na obrázku níže.
8. Pojmenuj organelu na obrázku níže.



Tajenka: (napíš, čím se zabývá věda, která ti vyšla v tajence)

.....

Správné řešení:

1. **BUŇKA**; 2. **JÁDRO**; 3. **FOTOSYNTÉZA**; 4. **CHLOROPLAST**; 5. **MITOCHONDRIE**;
6. **ŽIVOČIŠNÉ**; 7. **VAKUOLA**; 8. **CYTOPLAZMA**

Organela – funkce, vlastnost

Vytvoř dvojice v podobě číslo – písmeno.

1. Buněčná stěna
2. Cytoplazmatická membrána
3. Cytoplazma
4. Jádro
5. Chloroplasty
6. Mitochondrie
7. Vakuoly
8. Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát

- A. vnější, polopropustný pevný a pružný obal buňky
- B. obsahuje genetickou informaci buňky, zajišťuje dělení buňky
- C. obsahují pouze rostlinné buňky, obsahují zelené barvivo a probíhá v nich fotosyntéza
- D. propustný, vnější obal buněk bakterií, rostlin a hub, určuje tvar a chrání buňku před vnějšími vlivy
- E. vnitřní prostředí buňky
- F. systém membránových kanálků, slouží k výrobě a přenosu bílkovin
- G. probíhá v nich buněčné dýchání
- H. obvykle obsahují tekutinu, která se označuje jako buněčná šťáva, vyskytuje se hlavně u rostlinných buněk a bakterií

Odpovědi:

.....

.....

.....

.....

Správné řešení:

| | | |
|----|----|----|
| 1D | 2A | 3E |
| 4B | 5C | 6G |
| 7H | 8F | |

Rozhodni o ne/pravdě výroku

Pokud je výrok pravdivý, zakroužkuj ANO.

Pokud není výrok pravdivý, zakroužkuj NE.

| Výrok | Je výrok pravdivý? | |
|--|--------------------|----|
| 1. Prokaryotní buňky se dělí na rostlinné a živočišné buňky. | ANO | NE |
| 2. Prokaryotní i eukaryotní buňky obsahují pravé jádro. | ANO | NE |
| 3. V jádru je uložena genetická informace. | ANO | NE |
| 4. Buněčná stěna tvoří vnější obal buněk bakterií, rostlin a hub, určuje tvar buňky a chrání ji před škodlivými vlivy, je nepropustná. | ANO | NE |
| 5. Při fotosyntéze z cukrů vzniká oxid uhličitý. | ANO | NE |
| 6. Chloroplasty jsou uloženy pouze v rostlinných buňkách, obsahují zelené barvivo chlorofyl. | ANO | NE |
| 7. Endoplazmatické retikulum vytváří systém membránových kanálků, slouží k výrobě a přenosu bílkovin. | ANO | NE |
| 8. Cytoplazmatická membrána je pružný a pevný vnější obal, je polopropustná. | ANO | NE |
| 9. Cytoplazma je synonymum pro cytoplazmatickou membránu. | ANO | NE |
| 10. Vakuoly obvykle obsahují tekutinu, která se nazývá buněčná šťáva. | ANO | NE |

Správné řešení:

- | | |
|-------|--------|
| 1 NE | 6 ANO |
| 2 NE | 7 ANO |
| 3 ANO | 8 ANO |
| 4 NE | 9 NE |
| 5 NE | 10 ANO |

5.2.2 Didaktické hry pro vyšší stupeň gymnázií

Pracovní list – BUŇKA

1. Doplň vhodná slova do textu:

Buňka je základní a jednotka všech organismů. Podle vnitřního uspořádání dělíme buňky na a

Bakterie mají, zatímco houby, rostliny a živočichové mají

Buněčná stěna je celulózni.

Buněčná stěna je tvořena chitinem, buněčnou stěnu nikdy netvoří

2. Které buněčné struktury náleží prokaryotní a eukaryotní buňce? Spojovačka.

| | | |
|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | cytoplazmatická membrána | |
| | Ribozomy | |
| | buněčná stěna | |
| | Cytoplazma | |
| PROKARYOTNÍ BUŇKA | endoplazmatické retikulum | EUKARYOTNÍ BUŇKA |
| | Jádro | |
| | Jadérko | |
| | Golgiho aparát | |
| | Mitochondrie | |
| | Cytoskelet | |

3. Eukaryotní buňka: rozhodni o ne/pravdě výroku. Zakroužkuj.

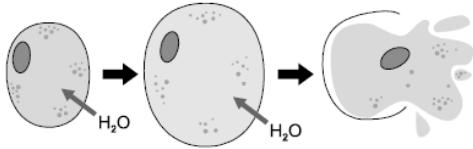
| Je výrok pravdivý? | ANO | NE |
|---|-----|----|
| Na povrchu všech eukaryotních buněk je buněčná stěna. | M | B |
| Jadérko je malé tělísko uvnitř jádra, vznikají zde ribozomy. | G | K |
| Cytoplazma je tvořena vodou, bílkovinami a rozpuštěnými látkami. | E | L |
| Na hladkém endoplazmatickém retikulu jsou navázány ribozomy, které vytvářejí bílkoviny. | F | I |
| Lysozomy jsou drobné váčky sloužící k buněčnému trávení. | O | B |
| V chloroplastech probíhá buněčné dýchání a v mitochondriích fotosyntéza. | H | O |
| V ribozomech vznikají bílkoviny. | I | S |
| Na povrchu jádra je dvojitá biomembrána s malými póry, uvnitř jádra je uložena DNA. | L | D |

4. Zakroužkuj správnou odpověď.

Cytoplazmatická membrána je **plně propustná/polopropustná**. Vložením buňky do roztoku, ve kterém je koncentrace solí odlišná od cytoplazmy, dochází k **osmotickým jevům/slapovým**

jevům. Hlavní příčinou těchto jevů je **difúze/osmóza.** To znamená, že voda samovolně proniká z míst **vyšší/nížší** koncentrace do míst s **vyšší/nížší** koncentrací.

5. Popiš jevy, které znázorňují jednotlivé obrázky.



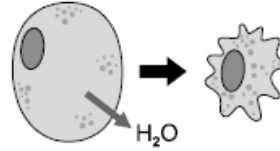
.....

.....

.....

.....

.....



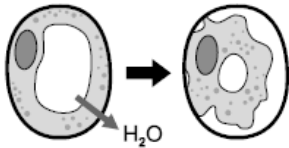
.....

.....

.....

.....

.....



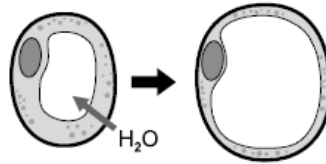
.....

.....

.....

.....

.....



.....

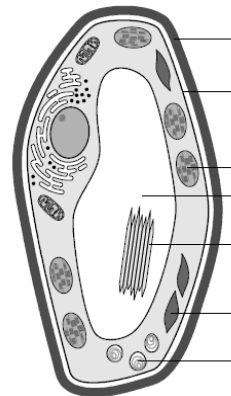
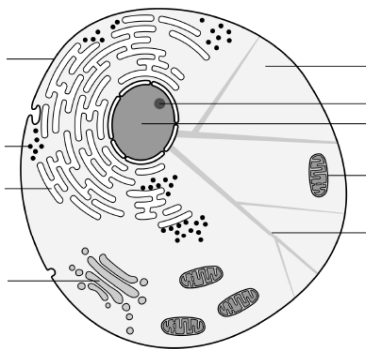
.....

.....

.....

.....

6. O jaký typ buňky se jedná? Popiš obrázky:



7. Nakresli a popiš prokaryotní buňku.

6 ZÁVĚR

V předložené diplomové práci jsou popsány základní charakteristiky čeledi Brassicaceae, dále je v teoretické části popsána izolace a kultivace protoplastů, mimo jiné faktory a podmínky jejich úspěšné realizace. Cílem praktické části byla izolace protoplastů z listů *Brassica oleracea* var. *botrytis*, odrůd: Beta, Bora, Igloo, Snowball X, Poranek a Octavian. Z izolovaných protoplastů byla vypočítána jejich hustota a životnost, pozornost byla věnována i regeneračním procesům. Nejvyšší hustota protoplastů byla zaznamenána u odrůdy Bora, nejnižší hustota u odrůdy Octavian. Životnost byla stanovena pomocí FDA, nejvyšší životnost vykazovala odrůda Bora, nejnižší životnost opět odrůda Octavian. Mikrokalusy byly zřetelné u odrůd Bora a Beta. U pěti odrůd byla vypočítána hranice životnosti přesahující 50 %. Takové výsledky jsou velmi povzbudivé. Určitě by bylo vhodné věnovat regeneraci odrůd, především Beta, Bora, mimo jiné i Snowball X, Poranek a Igloo, dále pozornost. Individuální optimalizace izolačních a kultivačních podmínek by mohla vést k regeneraci kalusů, potenciálně i celých rostlin u výše uvedených odrůd kvěťáku. U všech odrůd byly dodržovány shodné izolační podmínky, avšak hustota, životnost a regenerace se u jednotlivých odrůd lišily. Je tomu tak z důvodu lišících se genotypů jednotlivých odrůd. Genotyp má tedy významný vliv na izolaci, kultivaci i regeneraci rostlin.

7 LITERATURA

- [1] WARWICK, S. I., FRANCIS A., AL-SHEHBAZ I. A. (2006): Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. *Pl. Syst. Evol.* 259: 249-258.
- [2] NOVÁK, J., SKALICKÝ M. (2007): Botanika II.: systém rostlin. V Praze: Česká zemědělská univerzita. ISBN: 978-80-213-1688-1.
- [3] HENDRYCH, R. (1986): Systém a evoluce vyšších rostlin: učební přehled. 2. vyd. Ilustroval Přemysl Vanke. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 499 s.
- [4] KLÍMA, M. (2011): Protoplast cultures of selected members of the family brassicaceae. Disertace. Univerzita Palackého, Katedra botaniky.
- [5] DAVEY, M. R., ANTHONY, P., POWER, J. B., LOWE, K. C. (2005a): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23:131-171.
- [6] BHOJWANI, S. S., RAZDAN, M. K. (1996): Plant tissue culture: theory and practise. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, ISBN: 0-444-81623-2.
- [7] COCKING, E. C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:927-929.
- [8] NAVRÁTILOVÁ, B. (2004): Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae. *Hort. Sci.* 31:140-157.
- [9] BAJAJ, Y. P. S. (1974): Potentials of protoplast culture work in agriculture. *Euphytica* 23:633-649.
- [10] TAKEBE, I., OTSUKI, Y., AOKI, S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll protoplasts in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* 9:115-124.

- [11] POWER, J. B., COCKING, E. C. (1970): Isolation of leaf protoplasts: macromolecular up take and growth substance response. *J. Exp. Bot.* 21:64-70.
- [12] MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- [13] GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- [14] CARLSON, P. S., SMITH, H. H., DEARING, R. D. (1972): Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2292-2294.
- [15] DAVEY, M. R., ANTHONY, P., POWER, J. B., LOWE, K. C. (2005b): Plant protoplast technology: status and applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:202-212.
- [16] KAO, K. N., CONSTABEL, F., MICHAYLUK, M. R., GAMBORG, O. L. (1974): Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120:215-227.
- [17] ZIMMERMANN, U., SCHEURICH, P. (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electrical fields. *Planta* 151:26-32.
- [18] CHAWLA, H.S. (2002): Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Enfield, USA. ISBN: 1-57808-228-5.
- [19] ISHII, S. (1989): Enzymes for the Isolation of Protoplasts. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 23-33. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. ISBN: 978-3-642-73616-2.
- [20] BLACKHALL, N. W., DAVEY, M. R., POWER, B. (1994): Isolation, culture and regeneration of protoplasts, 27-40. Eds: Dixon, R. A., Gonzales, R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, Great Britain. ISBN: 0-19-963402-5.

- [21] VEILLEUX, R. E., COMPTON, M. E., SAUNDERS, J. A. (2005): Use of protoplasts for plant improvement, pp. 213 - 224. Eds: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (2005): Plant Development and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton–London–New York–Washington ISBN: 0849316146.
- [22] DOVZHENKO, A., DAL BOSCO, C., MEURER, J., KOOP, H. U. (2003): Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 222:107-111.
- [23] DODDS, J. H., ROBERTS, L. W. (1985): Experiments in plant tissue culture. 2nd ed. New York: Cambridge University Press. ISBN: 05-213-0478-4.
- [24] LAMPORT D. T. A., CLARK L. (1969): Isolation and partial characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides obtained by enzymic degradation of primary cell walls. *Biochemistry*, 8 (3), 1155-1163.
- [25] PURUGGANAN, M. D., BOYLES A. L., SUDDITH, J. I. (2000): Variation and selection at the cauliflower floral homeotic gene accompanying the evolution of domesticated *Brassica oleracea*. *Genetics*. vol. 155, no. 2, s. 855-862.
- [26] Rámcový vzdělávací program pro gymnázia [online]. In: Výzkumný ústav pedagogický v Praze, s. 104 [cit. 2019-06-04]. ISBN: 978-80-87000-11-3.
- [27] Národní ústav pro vzdělávání: Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání [online]. [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: http://www.nuv.cz/uploads/RVP_ZV_2016.pdf
- [28] Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy [online]. [cit. 2019-06-23]. Dostupné z: <http://www.msmt.cz/vzdelavani/skolstvi-v-cr/schvalovaci-dolozky-ucebnic-2013?highlightWords=dolo%C5%Beky>
- [29] Čabradová, V. (2005): Přírodopis 7: učebnice pro základní školy a víceletá gymnázia. Plzeň: Fraus. ISBN: 80-723-8424-4.

- [30] KUBIŠTA, V. (2000): *Obecná biologie: úvodní učební text biologie pro 1. ročník gymnázií*. 3., upr. vyd. Praha: Fortuna. ISBN: 80-716-8714-6.
- [31] LIU, S., SNOWDON, R., CHALHOUB, B. (2018): *The brassica napus genome*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-319-43692-0.
- [32] KAUR, N. D., VYVADILOVÁ, M., KLÍMA, M., BECHYNĚ, M. (2006): A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding - UZPI (Czech Republic)*. 42(3), 103-110. ISSN: 1212-1975.
- [33] FU, Y., SHI-RONG JIA S., LIN, Y. (1985): Plant regeneration from mesophyll protoplast culture of cabbage (*Brassica oleracea* var 'capitata'). *Theoretical and Applied Genetics*. 71(3), 495-499. DOI: 10.1007/BF00251195. ISSN: 0040-5752.
- [34] VATSYA, B., BHASKARAN, S. (1982): Plant regeneration from cotyledonary protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L.). *Protoplasma*. 113(2), 161-163. DOI: 10.1007/BF01282006. ISSN: 0033-183X.
- [35] XU, Z. H., DAVEY, M. R. A COCKING, E. C. (1982): Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Science Letters*. 24(1), 117-121. DOI: 10.1016/0304-4211(82)90016-5. ISSN: 03044211.
- [36] LU, D. Y., PENTAL, D., COCKING, E. C. (1982): Plant Regeneration from Seedling Cotyledon Protoplasts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 107(1), 59-63. DOI: 10.1016/S0044-328X(11)80009-7. ISSN: 0044328X.
- [37] GLIMELIUS, K. (1984): High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. *Physiologia Plantarum*. 61(1), 38-44. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1984.tb06097.x. ISSN: 0031-9317.
- [38] ULRICH, T.H., CHOWDHURY, J.B., HOWDHURY, J.M. (1980): Callus and root formation from mesophyll protoplasts of *Brassica rapa*. *Plant Science Letters*. 19(4), 347-354. DOI: 10.1016/0304-4211(80)90057-7. ISSN: 03044211.

- [39] ONDŘEJ, V., KITNER, M., DOLEŽALOVÁ, I., NÁDVORNÍK, P., NAVRÁTILOVÁ, B., LEBEDA, A. (2009): Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplasts of *Cucumis sativus* L. *Molecules and Cells* 27: 443-447.
- [40] TESSADORI, F., CHUPEAU, M. C., CHUPEAU, Y., KNIP, M., GERMANN, S., VAN DRIEL, R., FRANSZ, P., GAUDIN, V. (2007): Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentricheterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 120: 1200-1208.
- [41] AVRAMOVA, Z. V. (2002): Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences. *Plant Physiology* 129: 40-49.
- [42] ONDŘEJ, V., NAVRÁTILOVÁ, B., LEBEDA, A. (2009): The heterochromatin as a marker for protoplast differentiation of *Cucumis sativus*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96: 229-234.
- [43] BAŤKOVÁ P., POSPÍŠILOVÁ J., SYNKOVÁ H. (2008): Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. *Biologia Plantarum* 52: 413-422.
- [44] ONDŘEJ, V., NAVRÁTILOVÁ, B., PROTIVÁNKOVÁ, I., PITERKOVÁ, J., SEDLÁŘOVÁ, M., LUHOVÁ, L. LEBEDA A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress.
- [45] ZHAO, J., MOROZOVA, N., WILLIAMS, L., LIBS, L., AVIVI, Y., GRAFI, G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 22772-22778.
- [46] HU, Q., ANDERSEN, S. B., HANSEN, L. N. (1999): Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59(3), 189-196. DOI: 10.1023/A:1006417530587. ISSN: 01676857.

[47] JAIN, R. K., CHOWDHURY, J.B., SHARMA, D. R., FRIEDT, W. (1988): Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some Brassica species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 14(3), 197-206. DOI: 10.1007/BF00043410. ISSN: 0167-6857.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| MS | Murashige-Skoog |
| B5 | Gamborg |
| MES | kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová |
| 2,4-D | kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová |
| IBA | indol-3-máselná |
| BAP | 6-benzylaminopurin |
| NAA | naftyloctová kyselina |
| PEG | polyethylenglykol |
| FDA | fluorescein diacetát |
| BA | benzyladenin |
| CMS | cytoplazmatická samčí sterilita |
| RFLP | polymorfismus délky restrikčních fragmentů |
| RAPD | náhodná amplifikace polymorfní DNA |
| RVP | Rámcový vzdělávací program |
| ŠVP | Školní vzdělávací program |