

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Hodnocení ukazatelů fertility somatických hybridů
bramboru (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*
x S. bulbocastanum)**

Bakalářská práce

Autor práce: Marie Ježdíková

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

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že bakalářskou práci "Hodnocení ukazatelů fertility somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* x *S. bulbocastanum*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2013

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za trpělivé vedení a cenné rady, které mi velmi pomohly při zpracování této práce.

Hodnocení ukazatelů fertility somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* *x S. bulbocastanum*)

Souhrn

V úvodu této práce je popsána stavba rostliny bramboru. Dále se práce zabývá šlechtěním bramboru, kde jsou jako rodičovské odrůdy většinou využívány dobře kvetoucí odrůdy, které mají z pravidla fertilní pyl. V případech, kdy klasické šlechtitelské postupy z různých důvodů využít nelze, je možné křížit brambory somatickou hybridizací. Somatická hybridizace využívá fúze protoplastů, po které následuje selekce hybridních buněk a jejich kultivace. K dalšímu využití somatických hybridů v klasických šlechtitelských postupech je nutné znát jejich fertilitu. V této práci bylo hodnoceno 11 hybridních genotypů, u kterých byla zjišťována viabilita čerstvého a suchého pylu a jeho klíčivost.

Hybridní rostliny byly kultivovány *in vitro* a z důvodu přerůstání udržovány pasážováním. Na začátku dubna 2010 byly rostliny vysazeny do skleníku, v květnu pak byly vysazeny i na pole. V průběhu vegetace byl z kvetoucích rostlin odebrán pyl. Viabilita čerstvého i suchého pylu byla hodnocena diferenciačním barvením pomocí glycerol-acetokarmínu podle Zadiny a Jermoljeva (1976). Klíčivost byla určována na agarovém médiu připraveném podle Kowalczyka (2008).

Viabilita čerstvého i suchého pylu hodnocených hybridních genotypů rostlin (*Solanum tuberosum x Solanum bulbocastanum*) byla nižší než 6 %, jejich pyl je tedy téměř sterilní. Hodnocené genotypy vykazovaly výrazně nižší viabilitu pylu než nekulturní druhy rodu *Solanum* využití jako kontrolní genotypy. Suchý pyl vykazoval vyšší viabilitu než pyl čerstvý. Klíčivost pylu u všech hodnocených genotypů byla 0 %. Rostliny vykazovaly nízkou fertilitu pylu. Přesto mohou být dle mého názoru využity jako samičí rodičovští partneři ve zpětném křížení s kulturními druhy bramboru. Ovšem jejich fertilita může být v tomto směru také nízká. Pravděpodobnost jejich dalšího využití ve šlechtění bramboru jako samčích rodičovských partnerů je velmi malá.

Klíčová slova: *Solanum*, somatické hybridy, fertilita pylu

Evaluation of fertility indicators of potato somatic hybrids (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* x *S. bulbocastanum*)

Summary

The structure of potato plant is described in the introduction of this work. Further the work deals with the potato breeding in which well-flowering varieties, which usually have fertile pollen, are mostly used as parental varieties. In cases when it is not possible to use classical breeding procedures for various reasons, it is possible to breed potatoes by means of somatic hybridization. Somatic hybridization uses the fusion of protoplasts which is followed by the selection of hybrid cells and their cultivation. The knowledge of somatic hybrids fertility is necessary for their future use in classical breeding procedures. In this work, 11 hybrid genotypes have been evaluated, whose viability of fresh and dry pollen and pollen germination have been investigated.

Hybrid plants were cultivated *in vitro* and for the reasons of overgrowth were maintained by passaging. At the beginning of April 2010 the plants were planted to the greenhouse, and then in May the potatoes were replanted into the field. During the vegetation pollen was collected from flowering plants. Viability of fresh and dry pollen was evaluated by differential staining technique using acetocarmine according to Zadina and Jermoljev (1976). Germination was determined on agar medium prepared according to Kowalczyk (2008).

The viability of fresh and dry pollen of the evaluated hybrid genotypes of plants (*Solanum tuberosum* x *Solanum bulbocastanum*) was below 6%, thus their pollen is almost sterile. The evaluated genotypes displayed markedly lower pollen viability than wild species of genus *Solanum* used as control genotypes. Dry pollen displayed higher viability than fresh pollen. Pollen germination of all the investigated genotypes was 0 %. The plants displayed low pollen fertility. Nevertheless, in my opinion, they can be used as female parental partners in backcross breeding with cultural potato varieties. However, their fertility can also be low in this respect. The probability of the future use of these hybrid genotypes as male parental partners in potato breeding is very low.

Keywords: *Solanum*, somatic hybrids, pollen fertility

Obsah

1.	ÚVOD	7
2.	CÍL PRÁCE	8
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
3.1.	BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA BRAMBORU	9
3.1.1.	<i>Soustava nadzemních orgánů</i>	9
3.1.2.	<i>Soustava podzemních orgánů</i>	10
3.2.	ŠLECHTĚNÍ BRAMBORU	11
3.2.1.	<i>Novošlechtění bramboru</i>	12
3.2.2.	<i>Udržovací šlechtění bramboru</i>	12
3.3.	SOMATICKÁ HYBRIDIZACE BRAMBORU	13
3.3.1.	<i>Izolace protoplastů</i>	13
3.3.2.	<i>Fúze protoplastů</i>	14
3.3.3.	<i>Selekce hybridních buněk</i>	15
3.3.4.	<i>Kultivace produktů fúze protoplastů</i>	15
3.4.	VLASTNOSTI PYLU	16
3.4.1.	<i>Fertilita pylu</i>	17
3.4.2.	<i>Hodnocení fertility pylu</i>	17
4.	MATERIÁL A METODY	19
4.1.	VEDENÍ IN VITRO	19
4.2.	KULTIVACE A ODBĚR PYLU	20
4.3.	HODNOCENÍ VLASTNOSTÍ PYLU	21
4.3.1.	<i>Hodnocení viability pylu</i>	22
4.3.2.	<i>Hodnocení klíčivosti pylu</i>	22
4.3.3.	<i>Statistické hodnocení experimentů</i>	23
5.	VÝSLEDKY	24
5.1.	VIABILITA PYLU	24
5.2.	KLÍČIVOST PYLU	27
6.	DISKUZE	28
7.	ZÁVĚR	30
8.	SEZNAM LITERATURY	31

1. ÚVOD

Čeleď lilkovité (*Solanaceae* Juss.) zahrnuje velké množství hospodářsky významných rostlin. Rostliny této čeledi se využívají v lékařství a farmacii, v tabákovém průmyslu, ale i jako okrasné rostliny. V neposlední řadě jsou významnými potravinami; především pak druhy rodu lilek (*Solanum* L.). Bezpochyby nejvýznamnějším druhem je brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.), který je čtvrtou nejpěstovanější potravinou světa. Díky jeho neopomenutelnému významu pro lidskou výživu je bramboru věnovaná velká pozornost nejen z hlediska agrotechniky a ochrany proti chorobám a škůdcům, ale také z hlediska šlechtitelského.

Při šlechtění nových odrůd bramboru jsou často využívány nekulturní druhy rodu *Solanum*. Na novou odrůdu mohou přenést žádoucí vlastnosti, jako např. ranost, obsah nutričně významných látek, nebo rezistenci vůči chorobám a škůdcům. Problémem však může být častá neschopnost vzájemného křížení vybraných rodičovských partnerů, nebo jejich neschopnost přenést na potomstvo odpovídající úroveň požadovaného znaku. Jedním z možných způsobů překonání těchto překážek je vytvoření hybridních rostlin somatickou hybridizací.

Tato práce je zaměřena na hodnocení ukazatelů fertility somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* x *Solanum bulbocastanum* Dunal). Z výsledků práce bude možné posoudit somatické hybridy z hlediska jejich dalšího využití ve šlechtění bramboru.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo ověřit následující hypotézy: způsob pěstování rostlin nemá vliv na viabilitu pylu, úprava pylu sušením nemá vliv na jeho viabilitu a neexistuje rozdíl ve viabilitě hybridních rostlin a kontrolních genotypů. Tyto hypotézy jsou klíčové pro posouzení somatických hybridů bramboru (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* x *S.bulbocastanum*) z hlediska možnosti jejich dalšího šlechtitelského využití. Vlastní cíle práce vedoucí k ověření hypotéz byly následující.

- Založit pokusné výsadby ve skleníku a na demonstračním pozemku ČZU,
- posoudit viabilitu pylu získaného z obou výsadeb a to jak pylu čerstvého, tak pylu upraveného sušením,
- ověřit in vitro klíčivost pylu vybraných somatických hybridů.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA BRAMBORU

Tabulka č. 1: Taxonomická klasifikace

Taxonomická klasifikace	
Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	vyšší rostliny (<i>Cormobionta</i>)
Oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	krtičníkotvaré (<i>Scrophulariales</i>)
Čeleď	lilkovité (<i>Solanaceae</i>)
Rod	lilek (<i>Solanum</i>)
Druh	brambor hlíznatý (<i>Solanum tuberosum</i>)

Zdroj: Slavík (2000)

Rod lilek zahrnuje přes 2 000 druhů, z nichž jen asi 100 druhů tvoří hlízy. Běžné označení „brambor“ je používáno nejen pro kulturní, ale i příbuzné plané druhy rodu *Solanum*. Brambor je jednoletou bylinou. Mateřské hlízy po vyčerpání zásob v průběhu vegetace odumírají a spolu s nimi také všechny nadzemní a podzemní orgány mimo semena a nové (dceřiné) hlízy s živými spícími pupeny (Horáčková a Domkářová, 1998).

Morfologické znaky rostlin bramboru nejsou stabilní, mohou být ovlivněny počasím, stanovištěm, hustotou výsadby, některými chorobami, zvláště virovými, a též stářím rostlin. V hlavních rysech však zůstává charakter odrůdy za všech okolností zachován. Proto sledujeme morfologické znaky nově vyšlechtěných kříženců obvykle po několik let a stále je korigujeme (Zadina a Jermoljev, 1976).

3.1.1. Soustava nadzemních orgánů

Kultivary bramboru jsou charakterizovány typem natě; rozeznáváme typy listové a stonkové (Tomšovic, 2000). Listový typ se vyznačuje velkými a četnými listy, takže stonek

je listy zakryt; u stonkového typu naopak listy jsou drobné a stonek tak dobře vyniká. Některé odrůdy vykazují typy přechodné. Podle výšky trsu rozeznáváme trs vysoký, středně vysoký a nízký. Tvar trsu je typický pro jednotlivé odrůdy (Zadina a Jermoljev, 1976).

Lodyha je bohatě větvená, 60 – 100 cm vysoká, přímá až poléhavá (Tomšovic, 2000). Směrem nahoru stonek sílí; maximální tloušťky dosahuje pod listy a směrem ke květní části se pomalu zužuje (Hruška, 1974). Tvar stonku je charakteristický pro každou odrůdu. V průřezu bývá stonek hranatý, téměř kulatý a tříboký. Barva stonku bývá u většiny odrůd zelená nebo světle zelená, vyskytují se však i jiná typická zbarvení (Zadina a Jermoljev, 1976). Typickým znakem je pigmentování, které tvoří odstíny zbarvené od hnědočervené do tmavě fialové (Hruška, 1974).

List je složený lichožpeřený. Skládá se z řapíku a čepele listové. Čepel je tvořena lístky (v průměru 9 lístků), lichý lístek na vrcholu čepele se nazývá konečný; pod ním je několik párů postranních lístků, popřípadě i mezilístků – lístků druhého řádu. U některých odrůd se vyskytují na řapících lístků ještě lístečky třetího řádu nebo i tzv. úžlabní mezilístky. Barva listů bývá převážně zelená a tmavozelená (Zadina a Jermoljev, 1976).

Květy jsou v mnohokvětých vijanech, skládajících vrcholíky, na článkovaných stopkách (Tomšovic, 2000). Květ, umístěný na květní stopce, se skládá z kalichu, pěti kališních lístků, pěti korunních lístků, pěti tyčinek s prašníky a nitkami a z pestíku, složeného z blizny, čnělky a semeníku. Barva korunního lístku je základním rozeznávacím znakem odrůd (Zadina a Jermoljev, 1976), může být bílá, růžová nebo fialová. Prašníky jsou žluté až oranžové, k sobě skloněné (Tomšovic, 2000). Množství a fertilita pylu v prašníku může sloužit jako odrůdový znak (Zadina a Jermoljev, 1976). Brambory jsou samosprašnou rostlinou, ale mohou být opyleny i přenesením pylu hmyzem (Hruška, 1974).

Bobule bramboru jsou kulaté, jejich barva je zelená až žlutozelená a v průměru mají 20 – 40 mm. Semena bramboru mají zploštělý ledvinovitý tvar a jejich barva je bílá (Tomšovic, 2000).

3.1.2. Soustava podzemních orgánů

Brambor je vytrvalá bylina, v ČR je však pěstovaná jako jednoletá rostlina, se svazčitými kořeny (Tomšovic, 2000). Kořeny vyrůstají z uzlů matečné hlízy.

Při vegetativním množení vyrůstají pouze přímětné kořeny, které vytvářejí hustou kořenovou soustavu, jejíž objem i tvar je ovlivněn odrůdou, ale hlavně vlhkostí půdy, výživou a obděláváním (Hruška, 1974).

Hlíza je zdužnatělý konec stolonu; na hlíze rozeznáváme pupkovou část, kterou je hlíza připojena ke stolonu, a protilehlou korunkovou část (Zadina a Jermoljev, 1976). Hlízy nesou pupeny, běžně známé jako „očka“, které vyklíčí a vyrostou v rostlinu. Hlízy se začínají vytvářet při kvetení rostliny a jejich vývoj je ukončen s počátkem tvorby plodů (Bajaj, 1987a).

Pro charakteristiku odrůd bramboru jsou velmi důležité tvar a barva světelných klíčků vytvořených v rozptýleném světle. Na každém klíčku rozeznáváme ztloustlou část (spodní část), krček (střední část) a horní část - vegetační vrchol (Zadina a Jermoljev, 1976). Na spodní části se tvoří základy kořínků a stolonů. Střední část odpovídá nadzemní části stonku. Vrchní část pak představuje růstový vrchol zakrytý mladými listy (Hruška, 1974). Podle síly rozeznáváme klíčky silné, středně silné a slabé (Zadina a Jermoljev, 1976)

3.2. ŠLECHTĚNÍ BRAMBORU

Solanum tuberosum je čtvrtou nejdůležitější pěstovanou plodinou světa; po rýži, kukuřici a pšenici. Původně byla v Jižní Americe domestikována řada diploidních druhů, ovšem brambory přivezené do Evropy ve druhé polovině 16. století byly ze spontánní tetraploidní linie, která vznikla u jezera Titicaca. Brambor pěstovaný v dnešní době je tetraploidní druh se 48 chromozomy (Millam a Davie, 2001).

Šlechtění bramboru je těžkým úkolem, především vzhledem k tetrasomické dědičnosti, vysoké heterozygotnosti, autoinkompatibilitě a samčí sterilitě vyskytující se u mnoha druhů (Ancora a Sonnino, 1987). Kvůli vegetativnímu množení je značně omezena i genetická variabilita. Naštěstí řada inovativních šlechtitelských a biotechnologických postupů včetně genetické manipulace vedla k úspěšnému vytvoření a udržení nové genetické variability a produkci rostlin odolných vůči chorobám (Cardi, 2001).

Cíl šlechtění je dán výnosem, zejména výnosem tržního podílu hlíz, vysokým obsahem sušiny (hodnotí se objemovou hmotností a je důležitý pro další zpracování), stolní hodnotou hlíz, vhodností pro průmyslové zpracování (potraviny, škrob), obsahem redukcujících cukrů, obsahem glykoalkaloidů, skladovatelností, odolností k chorobám a škůdcům (strupovitosti,

virózám, plísní, rakovině, háďátku aj.). Obecně je třeba zdůraznit, že nová odrůda by spíše neměla mít žádnou špatnou vlastnost, než se snažit o kombinaci co nejvíce dobrých vlastností (Chloupek, 2000).

3.2.1. Novošlechtění bramboru

V novošlechtění bramboru je nezbytný generativní způsob množení, neboť v semenné populaci se projeví kombinace vlastností rodičovských partnerů a po podchycení žádoucích klonů probíhá další rozmnožování vegetativním způsobem, který projev vysoké heterozygotnosti eliminuje a zachovává vlastnosti F1 generace. Uchovávání vzorků ve formě semen lze využít pouze u omezeného souboru fertálních planých a kulturních druhů rodu *Solanum* (Horáčková a Domkářová, 1998).

Ve šlechtění se většinou používá rekurentní fenotypová selekce, přičemž se v jednotlivých cyklech využívá individuální fenotypová selekce. Každý cyklus začíná křížením, zejména křížením adaptovaných odrůd, ale jako donory rezistence lze využít i jiné botanické druhy (Chloupek, 2000). Křížení je základním opatřením v novošlechtění bramboru. Jeho účelem je přenesení vhodných vlastností dvou odrůd bramboru (rodičovských partnerů) na odrůdu novou. Za rodičovské partnery jsou vybírány především odrůdy, které dobře kvetou. Tyto odrůdy mají většinou fertální (klíčivý) pyl, takže jsou dobře využitelné jako odrůdy mateřské i jako odrůdy otcovské. O výsledku křížení rozhoduje nejen intenzita kvetení odrůd brambor, ale i jejich vzájemná křížitelnost (Zadina a Jermoljev, 1976).

Výsledek šlechtitelské práce u brambor, stejně jako u ostatních plodin, závisí především na správném výběru rodičovských partnerů a správném výběru (selekce) v potomstvu z jejich nakřížení. Brambory jsou plodinou silně heterozygotní, potomstvo z nakřížení se vyznačuje velmi silným štěpením v jednotlivých vlastnostech. Předpokladem úspěchu ve šlechtění je proto vedení vysokého počtu semenáčů (Zadina a Jermoljev, 1976).

3.2.2. Udržovací šlechtění bramboru

Udržovacímu šlechtění bramboru v porovnání s udržovacím šlechtěním většiny ostatních zemědělských plodin připadá zvláštní postavení, které vyplývá z toho, že brambor je plodina udržovaná a množena vegetativně – hlízami. Zatímco udržovací šlechtění většiny zemědělských plodin je vzhledem k jejich generativnímu množení problémem prakticky

genetickým, u bramboru v současné době hledisko genetické ustupuje do pozadí a udržovací šlechtění brambor se stává z největší části problémem fytopatologickým. Příčinou toho jsou virová onemocnění, která se přenášejí hlízkami z generace na generaci (Zadina a Jermoljev, 1976).

Cílem udržovacího šlechtění bramboru je udržení odrůd v dosavadním typu a výnosnosti, v dobrém zdravotním stavu a v dobré kvalitě. K udržení odrůdových znaků a dobrého zdravotního stavu se provádí každoročně opakovaný individuální výběr. Jedním z velice důležitých úkonů jsou negativní výběry – odstranění příměsí cizích odrůd a nemocných rostlin z pole (Zadina a Jermoljev, 1976).

3.3. SOMATICKÁ HYBRIDIZACE BRAMBORU

Somatická hybridizace je potenciální metoda pro získání hybridních rostlin mezi příbuznými i nepříbuznými rostlinami. K jejímu využití dojde zejména tam, kde konvenční šlechtění nemá úspěch. I přes mnohé těžkosti a úskalí, která s sebou nese, je i v současné době úspěšných transformací mocným nástrojem přenosu velkých částí genetické informace z donora do recipienta (Greplová a Horáčková, 2000). Může překonat sexuální inkompatibilitu a poskytnout nové šlechtitelské materiály (Greplová a kol., 2010).

Symetrická somatická hybridizace rovnocenně kombinuje jaderný i mimojaderný genom, což je spojeno s větším výskytem nežádoucích vlastností planého druhu v nově získaném šlechtitelském materiálu. Asymetrická somatická hybridizace tento problém částečně řeší eliminací jaderného genomu planého rodiče (Greplová a kol., 2010). Touto cestou lze přenést hospodářsky cenné vlastnosti, jako například zvýšenou odolnost vůči nízkým teplotám, odolnost proti chorobám a škůdcům. Nově vzniklé heterozygotní konstrukty lze množit vegetativně, tedy i ve šlechtění bramboru má tato metoda budoucnost. Použitelnost somatických hybridů v klasických šlechtitelských postupech závisí na schopnosti zpětného křížení s bramborem, a tedy na fertilitě (Greplová a Horáčková, 2000).

3.3.1. Izolace protoplastů

Somatická hybridizace využívá fúze protoplastů. Protoplasty jsou rostlinné buňky ohraničené plasmatickou membránou, zbavené tuhé buněčné stěny. Jsou tedy velmi citlivé

vůči podmínkám okolního prostředí (Greplová a Horáčková, 2000). Celý proces izolace protoplastů probíhá ve sterilním prostředí (Greplová a kol., 2010). Buněčná stěna je odstraněna pomocí enzymů hydrolyzujících polysacharidy, obvykle pektináz, které poruší střední lamelu mezi stěnami přilehlých buněk a celuláz rozkládajících buněčné stěny. V praxi, při izolaci protoplastů z konkrétního dárce, nelze předpokládat optimální podmínky. Hlavním důvodem jsou pravděpodobně rozdíly ve složení stěny u materiálů z různých zdrojů (Li a kol., 1999). Protoplasty musí být dokonale zbaveny zbytků natrávených pletiv i stop enzymatické směsi. Toto čištění se provádí opakovanou centrifugací tak, aby nedošlo k jejich rozpraskání (Greplová a Horáčková, 2000).

Nejčastěji používaným a pravděpodobně nejlepším zdrojem dárců jsou mladé listy z řízků kultivovaných *in vitro* a suspenze aktivně se dělících buněk. Dvěma hlavními důvody jejich oblíbenosti jsou hojnost dárcovského materiálu a poměrně vysoký výnos protoplastů. Další výhodou je, že při využití suspenze buněk bezbarvých protoplastů jsou od zelených protoplastů listů dobře odlišitelné a usnadňují tak identifikaci vzniklých buněk hybridních. Nevýhodou využívání suspenze buněk je genetická nestabilita. Častým jevem u dlouhodobých kultur buněčných suspenzí je aneuploidie a snížení schopnosti regenerace (Li a kol., 1999).

3.3.2. Fúze protoplastů

Na základě dnešních technologií mohou být úspěšně spojeny buňky jakýchkoli dvou druhů. Fúze protoplastů a obnovy produktů fúze bylo doposud nejlépe dosaženo buď použitím polyetylglykolu (PEG) nebo elektrickou stimulací (Li a kol., 1999).

Finančně výrazně méně náročný je postup s využitím PEG jako fúzantu. Protoplasty se v první fázi musí shluknout (aglutinace protoplastů), aby se vytvořil co nejtěsnější kontakt velkých částí membrán. PEG navozuje tuto aglutinaci a má rovněž vliv na narušení fosfolipidové dvojvrstvy v místě adheze membrán a tak může následovat fúze (Greplová a Horáčková, 2000). Během následného vymývání jsou molekuly PEG, které se již navázaly na buněčnou membránu, z membrány odstraněny; při použití hypotonického vymývacího roztoku může buněčné membrány postihnout osmotický šok. Metoda PEG má široké využití pro fúzi protoplastů různých druhů rostlin. Nečistoty obsažené v komerčních přípravcích PEG bývají často spojovány s výskytem cytotoxicity nebo snížením viability produktů fúze

a některé, zejména lipofilní nečistoty, snižují četnost fúzí. Bylo také zjištěno, že PEG způsobuje deformace mitochondrií (Li a kol., 1999).

Nelze proto opomenout metodu fúze protoplastů pomocí elektroporátoru, kde aglutinaci i fúzi zabezpečí elektrické pole. Proti chemické fúzi se tak lze vyhnout relativně toxickým substancím. Metoda je velmi rychlá a účinná. Umožňuje vyšší procento fúzí, až 50 %. K seřazení protoplastů se zde uplatní střídavý proud a pro indukci membránové fúze jeden až tři pulzy stejnosměrného proudu po dobu 50 – 100 μ s. Metoda je náročná na investice (Greplová a Horáčková, 2000). Optimální elektrická fúze může produkovat velké množství životaschopných dvoujaderných buněk. Parametry, jako napětí, frekvence a délka působení střídavého a stejnosměrného proudu, hustota protoplastů a vlastnosti buněčné membrány mohou ovlivnit průběh seřazení a fúze protoplastů a stejně tak viabilitu produktů fúze (Li a kol., 1999).

3.3.3. Selekce hybridních buněk

V populaci produktů fúze je vždy více nezkřížených buněk než hybridů. Nezkřížené buňky zahrnují buňky s jedním jádrem i parentální protoplasty, které neprodělaly fúzi. Pokud kultivační podmínky nejsou vytvořeny ve prospěch buněk, které fúzi prodělaly, překryjí je četnější buňky nezkřížené. Buněčné dělení protoplastů vyžaduje vysokou hustotu kultury, ale hustota hybridních buněk v populaci produktů fúze je zpravidla velmi malá a často jsou obklopeny toxickým buněčným odpadem a odumřelými buňkami. Selektce na buněčné úrovni je daleko více ekonomicky náročná než na úrovni rostlin (Li a kol., 1999).

3.3.4. Kultivace produktů fúze protoplastů

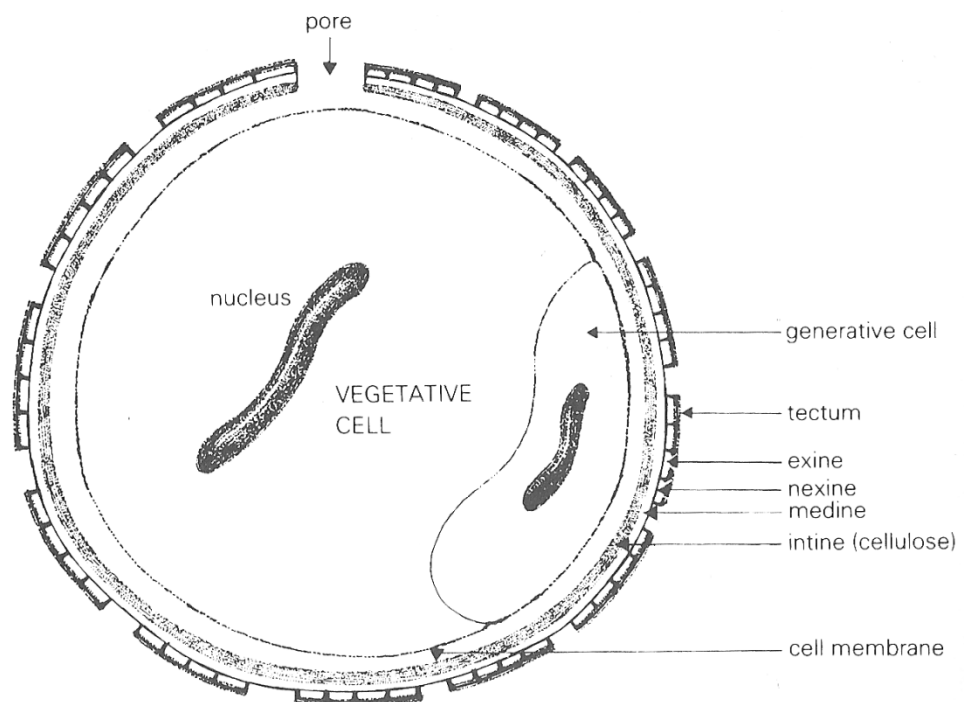
Celý proces kultivace produktů fúze probíhá ve sterilním prostředí. První buněčné dělení se obvykle uskuteční 2 – 3 dny po fúzi (Greplová a kol., 2010). Protoplasty jsou kultivovány v tekutém médiu nebo v kapkách zpevněných agarózou a zalitých tekutým médiem. Kultivace probíhá z počátku ve tmě a později na světle se vzrůstající intenzitou osvětlení, při teplotě okolo 24°C. Dalším faktorem, který ovlivňuje regenerační schopnost je počáteční koncentrace vysetých protoplastů. Běžné rozmezí kolísá v rozsahu 10^4 – 10^6 v 1 ml suspenze. Pro zvolený genotyp je třeba najít optimální koncentraci. Za vhodných podmínek protoplasty regenerují buněčnou stěnu a poté podstupují dělení a tvoří mikrokolonie až mikrokalusy, které se pasážují na nová média s jinou skladbou růstových

regulátorů a živných komponent. Médium umožní zakořenění a další růst (Greplová a Horáčková, 2000). Pro šlechtitelské účely musí heterokaryony podstoupit buněčné dělení, morfogenezi a přerod v rostliny (Li a kol., 1999).

3.4. VLASTNOSTI PYLU

Pylová zrna obsahují samčí pohlavní buňky. Zpravidla jsou uvolňována za sucha a jejich vlhkost je nižší než 20%. Při uvolňování jsou pylová zrna buď dvoubuněčná – velká vegetativní buňka obklopující buňku generativní; nebo trojbuněčná – vegetativní buňka a dvě buňky spermatické, které vznikly rozdělením generativní buňky (Shivanna a Sawhney, 1997). Dvoubuněčná pylová zrna mají v přírodních podmínkách díky ochranné struktuře, nízkému obsahu vody v plazmě a redukované metabolické aktivitě mnohem delší životnost. Oproti tomu životnost trojbuněčných pylových zrn je, kvůli méně odolné struktuře stěny a vysoké vlhkosti, krátká (Barnabás a Kovács, 1997). Velikost a tvar pylových zrn je značně variabilní (Shivanna a Sawhney, 1997).

Obrázek č. 1: Stavba pylového zrna



Zdroj: Richards (1997)

Pylové zrno je tvořeno vnější stěnou (exinou) sloupcovité struktury, umístěnou mezi souvislou vnitřní vrstvou (nexinu) a perforovanou vrstvou vnější. Exina je primárně tvořena lipoproteinem sporopoleninem, zatímco vnitřní stěnu (intinu) tvoří celulóza. Exinu mohou pokrývat různé ostny, brázdy, atd., a obvykle má jeden až čtyři póry (Richards, 1997).

Jednou z hlavních překážek sexuální rekombinace u hybridů brambor je sterilita pylu. Sterilita a různá úroveň fertility pylu může být způsobena inbreední depresí nebo interakcí genů jádra a cytoplazmy (Trognitz, 1991).

Z šlechtitelského hlediska je také velmi důležitá konzervace pylu. Pyl je uchováván pomocí řady metod, jakými jsou zmrazení, sušení mrazem a ve vakuu, použitím organických rozpouštědel, atd. Nicméně u těchto metod postupem času dochází k redukci nebo ke ztrátě viability pylu. Proto se k dlouhodobému uchování genofondu doporučuje skladovat pyl v tekutém dusíku (Bajaj, 1987b).

3.4.1. Fertilita pylu

Viabilita pylu je ukazatelem schopnosti pylového zrna dodat po opylení spermatické buňky do zárodečného vaku (Wang a kol., 2004). U somatických hybridů je viabilita pylu zpravidla nízká. Může být nestabilní dokonce i u vegetativních klonů hybridních rostlin a/nebo může být omezena schopnost viabilního hybridního pylu křížit se s cílovými rostlinami. Důležitým faktorem může být chromozomální nestabilita. Eliminace chromozomů u některých hybridních rostlin pokračuje a počet chromozomů mezi klony a původními hybridními rostlinami je rozdílný (Li a kol., 1999).

3.4.2. Hodnocení fertility pylu

Posuzování viability pylu na základě jeho funkčnosti je časově náročné a ne vždy vhodné. Je známo mnoho jednodušších metod vyjadřujících schopnost pylu plnit svoji funkci. Viabilita pylu může být hodnocena pomocí různých technik barvení (např. tetrazoliovými solemi pro detekci činnosti dehydrogenázy, anilinovou modří pro detekci kallosy v pylových stěnách a v pylové láčce, jódem pro stanovení obsahu škrobu, fluorescein diacetátem pro stanovení aktivity esterázy a neporušenosti plazmatické membrány), testů klíčivosti *in vitro* a *in vivo* nebo analýzou konečného souboru semen (Wang a kol., 2004). Soubor semen podává nejpřesnější odhad viability pylu. Na úspěšnost oplození však mohou mít silný

vliv přírodní podmínky při opylení, proto je doporučena komplexní srovnávací analýza souboru semen s klíčivostí pylu *in vitro* (Barnabás a Kovács, 1997). Výběr metody závisí na plodině nebo druhu (Wang a kol., 2004). Ze šlechtitelského hlediska je důležité znát odrůdy s vysokou oplozovací schopností (odrůdy vysoce fertlní). K jejich určení je možné využít metodou karmínovou, nebo metodou sacharózoagardiasázovou (Zadina a Jermoljev, 1976).

4. MATERIÁL A METODY

Genotypy použité v této práci byly získány v roce 2009 somatickou hybridizací mezi druhy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a *Solanum bulbocastanum*. Původně byly určeny pro výzkum vlivu křížení kulturních a planých odrůd bramboru na výskyt plísně bramborové (*Phytophthora infestans* Mont.), který proběhl na Katedře genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze. V této práci bylo hodnoceno 11 hybridních genotypů (REG 28 F, 32 F, 34 F, 40 F, 43 F, 44 F, 46 F, 47 F, 48 F, 67 F a 69 F) a několik planých a kulturních druhů rodu *Solanum* (*S. chacoense* Bitter, *S. melongena* L., *S. microdontum* Bitter, *S. polytrichon* Rydb. a *S. yungasense* Hawkes), které byly využity jako referenční genotypy, jelikož nemají problém s viabilitou ani klíčivostí pylu. Dále byly hodnoceny vlastnosti pylu dvou genotypů *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (DH 387 a odrůda Apta) a rostlin vzniklých regenerací protoplastů *S. bulbocastanum* (REG 5).

4.1. VEDENÍ IN VITRO

Hybridní rostliny byly kultivovány *in vitro* a z důvodu přerůstání udržovány pasážováním. Byly pěstovány na kultivačním médiu ve skleničkách uzavíratelných umělohmotným víčkem. Pěstební médium pro kultivaci *in vitro* bylo připraveno z následujících složek:

MS médium	4,4 g
Sacharóza	20,0 g
Agar	7,0 g
KOH	

pH této směsi bylo upraveno na hodnotu 5,8. 25ml média bylo nalito do kultivační nádoby o objemu 0,2l. Pěstební médium v uzavřených skleničkách bylo sterilizováno ve stolním autoklávu (Tuttenauer) 10 – 15 min při 120 °C.

Pasážování bylo provedeno sterilně v laminárním boxu Gelaire. Pasážovaná rostlina byla segmentována na jednopupenové řízky. Do každé skleničky byly umístěny 3 – 4 řízky. Skleničky byly uzavřeny a víčko bylo zajištěno parafilmem. Od každého genotypu byly kultivovány 2 – 3 skleničky ve vlhčených kultivačních boxech (Sanyo) při fotoperiodě 16 h světlo při teplotě 25 °C a 8 h tma při teplotě 18 °C.

Obrázek č. 2: Kultivační box vlhčený (Sanyo)



Zdroj: archiv Katedry genetiky a šlechtění

4.2. KULTIVACE A ODBĚR PYLU

Pro potřebu této práce byly rostliny z prostředí *in vitro* převedeny do prostředí *ex vitro*. Kvůli adaptaci byly rostliny nejprve přesazeny do perlitu. Přibližně po týdnu, na začátku dubna 2010, byly vysazeny do skleníku. V květnu byly vzrostlé rostliny vysazeny i na pole. V polní části pokusu byly využity bramborové hlízy získané z polního pokusu provedeného v roce 2009, původně určeny pro výzkum vlivu křížení kulturních a planých odrůd bramboru na výskyt plísně bramborové (*Phytophthora infestans*), který proběhl na Katedře genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze. Od každého genotypu bylo vysazeno pět hlíz. V průběhu vegetace byly brambory ošetřeny přípravkem Mospilan 20 SP proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata* Say), kvůli signalizaci jejího

zvýšeného výskytu. Kultivace proběhla na pokusném pozemku České zemědělské univerzity v Praze, nacházejícím se v městské části Praha 6 – Suchdol.

V průběhu vegetace, během července a srpna, byl z kvetoucích rostlin odebrán pyl. Sbírány byly celé otevřené květy. Odběry pylu byly prováděny v průběhu dopoledne. Vlastnosti pylu byly hodnoceny jednak ihned u pylu čerstvého, ale také později po jeho usušení.

Obrázek č. 3: Květy a květenství *S. bulbocastanum* a somatických hybridů



Popis obrázku: a + b – květ a květenství somatických hybridů *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* + *S. bulbocastanum*, c + d - květ a květenství *S. bulbocastanum*

Zdroj: archiv Katedry genetiky a šlechtění

4.3. HODNOCENÍ VLASTNOSTÍ PYLU

U sebraného materiálu byla hodnocena viabilita čerstvého a šetrně usušeného pylu a schopnost pylu klíčit. Hodnocení bylo prováděno zvlášť u rostlin z pole a zvlášť u rostlin pěstovaných ve skleníku.

4.3.1. Hodnocení viability pylu

Viabilita čerstvého i suchého pylu byla hodnocena diferenciačním barvením pomocí glycerol-acetokarmínu podle Zadiny a Jermoljeva (1976). Na podložní sklíčko byla z prašníků opatrně přenesena řídká vrstva pylu. Pipetou bylo nanášeno 40 µl barviva glycerol-acetokarmínu. Po 1 hodině působení byl preparát diferencován kyselým alkoholem tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému odbarvení glycerol-acetokarmínu a sklíčko bylo téměř bezbarvé. Takto připravený preparát byl pozorován pod světelným mikroskopem. Viabilní pylová zrna měla kulovitý tvar, jejich okraj byl silně zbarven a střed byl o několik odstínů světlejší. Sterilní pylová zrna byla různě deformovaná, neobarvená, nebo obarvená jen velmi slabě.

Počet viabilních zrn v preparátu byl určen z deseti různých náhodně vybraných zorných polí. Viabilita pylu byla vyjádřena v procentech, jako podíl viabilních pylových zrn z celkového počtu pozorovaných zrn.

4.3.2. Hodnocení klíčivosti pylu

U šetrně usušených pylových zrn byla hodnocena jejich klíčivost. Klíčivost byla určována z preparátů připravených v petriho miskách naplněných agarovým médiem. Médium pro klíčení pylu bylo připraveno podle Kowalczyka (2008) tímto způsobem:

Ca (NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	60 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	40 mg
KNO ₃	20 mg
sacharóza (2%)	4 g
agar	0,9 g / 200 g
KOH	

Agar byl rozpuštěn v 50 ml zahřáté vody, zbylé přísady byly rozpuštěny ve 100 ml vody a pH tohoto roztoku bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 5,8. Roztoky agaru a zbylých složek byly smíchány a doplněny vodou do objemu 200 ml. Médium bylo pipetou rozděleno po 6 ml do petriho misek a přiklopeno víčkem.

Pyl hodnocených genotypů byl přenesen na podložní sklíčko, odtud potom opatrně do petriho misky. Víčka petriho misek byla zajištěna parafilmem. Preparáty byly vyhodnoceny pod světelným mikroskopem po 24 hodinách.

Počet klíčících zrn v preparátu byl určen z deseti náhodně vybraných zorných polí. Klíčivost pylu byla vyjádřena v procentech, jako podíl klíčících pylových zrn z celkového počtu pozorovaných zrn.

4.3.3. Statistické hodnocení experimentů

Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí párového a dvouvýběrového t-testu s využitím statistických funkcí tabulkového procesoru Microsoft Office Excel 2007.

5. VÝSLEDKY

5.1. VIABILITA PYLU

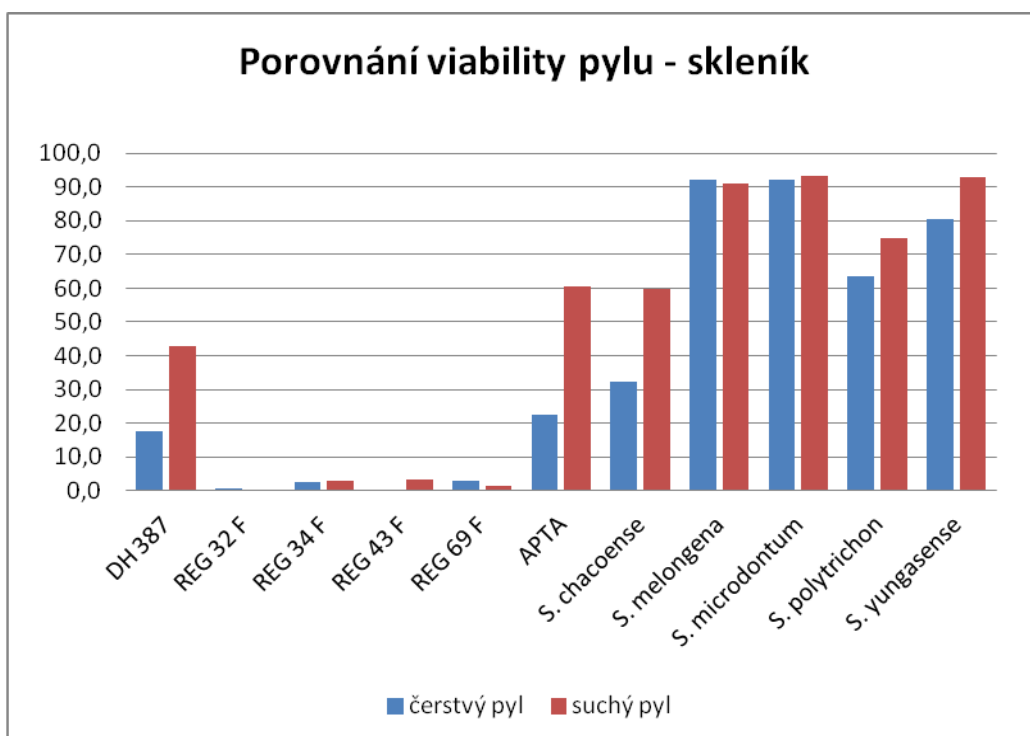
Viabilita čerstvého i suchého pylu byla hodnocena jak u rostlin pěstovaných ve skleníku, tak u rostlin z pole. Bylo hodnoceno 11 hybridních rostlin, 5 druhů rodu *Solanum* (*S. chacoense*, *S. melongena*, *S. microdontum*, *S. polytrichon* a *S. yungasense*), dva genotypy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (DH 387 a odrůda Apta) a rostliny vzniklé regenerací protoplastů *S. bulbocastanum* (REG 5). Viabilita pylu hybridních rostlin se pohybovala mezi 0–5,7 %, u ostatních genotypů dosahovala hodnot od 17,7 do 93,4 % (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Viabilita pylu

genotyp	čerstvý pyl skleník (%)	suchý pyl skleník (%)	čerstvý pyl pole (%)	suchý pyl pole (%)
DH 387	17.7	42.9	32.5	-
REG 5	-	84.2	-	-
REG 28 F	-	0.7	4.5	-
REG 32 F	0.8	0.3	-	0
REG 34 F	2.6	3.0	4.6	1.7
REG 40 F	-	1.5	1.1	-
REG 43 F	0.0	3.4	2.9	3.2
REG 44 F	-	5.7	1.1	0.2
REG 46 F	-	-	3.1	1.2
REG 47 F	-	2.1	2.4	-
REG 48 F	-	3.7	-	-
REG 67 F	-	2.8	3.2	-
REG 69 F	2.8	1.3	2.8	-
Apta	22.4	60.6	-	-
<i>S. chacoense</i>	32.4	60.0	-	-
<i>S. melongena</i>	92.3	91.0	-	-
<i>S. microdontum</i>	92.0	93.4	-	-
<i>S. polytrichon</i>	63.4	75.0	-	-
<i>S. yungasense</i>	80.4	92.8	-	-

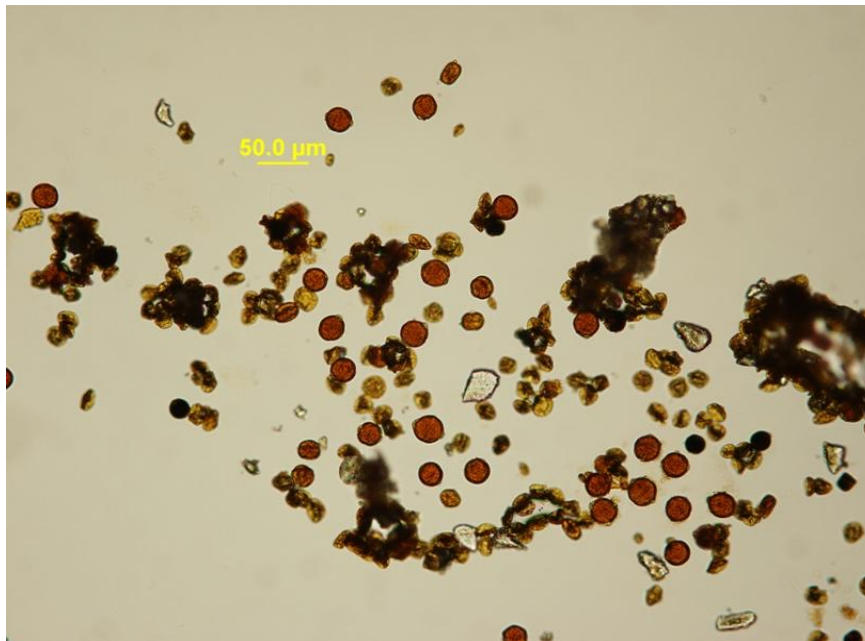
Parametry viability pylu byly porovnávány pomocí Studentova t-testu. Viabilita čerstvého pylu z pole a ze skleníku byla porovnána párovým t-testem a výsledkem $p = 0,1454$ byla potvrzena hypotéza, že původ pylu nemá vliv na jeho viabilitu. U pylu získaného z rostlin pěstovaných ve skleníku byl proveden také párový t-test, který výsledkem $p = 0,0146$ odmítá hypotézu, že úprava pylu nemá vliv na jeho viabilitu. Sušení mělo na viabilitu pylu pozitivní vliv (obrázek č. 4).

Obrázek č. 4: Graf porovnání viability suchého a čerstvého pylu u rostlin pěstovaných ve skleníku



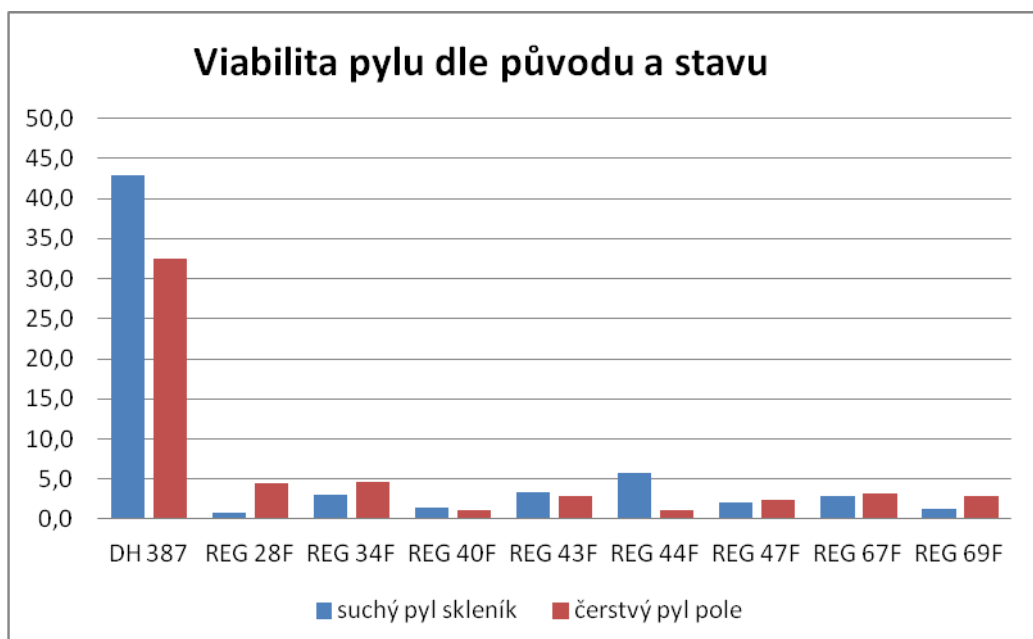
Dvouvýběrovým t-testem při různých rozptylech byla porovnána průměrná viabilita pylu hybridních rostlin s průměrnou viabilitou pylu nekulturních druhů rodu *Solanum* využitých jako kontrolních genotypů. Výsledek $p = 7,19371e^{-05}$ vyvrací předpoklad, že neexistuje rozdíl ve viabilitě hybridních rostlin a kontrolních genotypů.

Obrázek č. 5: Viabilita barveného pylu hybridních genotypů



Dále byl proveden párový t-test porovnávající viabilitu suchého pylu z rostlin pěstovaných ve skleníku a viabilitu pylu čerstvého odebraného z rostlin z pole. Výsledkem tohoto testu $p = 0,529701$ byla potvrzena hypotéza, že na viabilitu nemá vliv stav (čerstvý x suchý) a původ (skleník x pole) hodnoceného pylu (obrázek č. 6).

Obrázek č. 6: Graf viability pylu dle původu a stavu



5.2. KLÍČIVOST PYLU

Klíčivost pylu byla stanovena u rostlin vypěstovaných ve skleníku i u rostlin pěstovaných na poli. Hodnoceno bylo 11 hybridních genotypů (REG 28 F, 32 F, 34 F, 40 F, 43 F, 44 F, 46 F, 47 F, 48 F, 67 F a 69 F), dva genotypy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (DH 387 a odrůda Apta), 5 druhů rodu *Solanum* (*S. chacoense*, *S. melongena*, *S. microdontum*, *S. polytrichon* a *S. yungasense*) a rostliny vzniklé regenerací protoplastů *S. bulbocastanum* (REG 5). Klíčivost rostlin pěstovaných ve skleníku i rostlin vypěstovaných na poli byla 0 %.

6. DISKUZE

V této práci byla hodnocena viabilita a klíčivost pylu jedenácti hybridních genotypů bramboru (REG 28 F, 32 F, 34 F, 40 F, 43 F, 44 F, 46 F, 47 F, 48 F, 67 F a 69 F), které vznikly somatickou hybridizací mezi *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* a *Solanum bulbocastanum*, a rostlin vzniklých regenerací protoplastů *S. bulbocastanum* (REG 5). Dále bylo hodnoceno 5 druhů rodu *Solanum* (*S. chacoense*, *S. melongena*, *S. microdontum*, *S. polytrichon* a *S. yungasense*) a dva genotypy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (DH 387 a odrůda Apta), u kterých bylo předpokládáno, že nemají problém s viabilitou pylu a tedy mohou být využity jako referenční genotypy. Viabilita pylu těchto kontrolních genotypů se pohybovala mezi 17,7 a 92,3 % u čerstvého pylu a mezi 42,9 - 93,4 % u pylu suchého, předpoklad byl tedy správný.

Zjištění viability suchého i čerstvého pylu bylo v této práci provedeno metodou barvení pylu acetokarmínem. Tato metoda byla v minulosti využita mnoha autory ke stanovení viability pylu somatických hybridů *Solanum tuberosum* s planými druhy rodu *Solanum* (Cardi a kol., 1993; Ehlenfeldt a Helgeson, 1987; Yermishin a kol., 2006). Yermishin a kol. (2006) uvádí, že pyl získaný z rostlin vzniklých křížením mezi *Solanum tuberosum* a *Solanum bulbocastanum* byl prakticky sterilní. Jeho viabilita se pohybovala mezi 9 – 25 %. Viabilita barveného pylu hodnoceného v této práci dosahovala hodnot od 0 % do 5,6 %, tento pyl tedy může být považován také za sterilní.

Z této práce vyplývá, že na viabilitu pylu nemá vliv to, zda byly rostliny kultivovány ve skleníku, nebo na poli. Dále bylo zjištěno, že viabilita pylu byla ovlivněna jeho úpravou. Usušený pyl vykazoval vyšší procento viabilních zrn než pyl čerstvý. Příčinou této anomálie mohl být způsob jeho sušení. Usušeny byly celé prašníky, až poté z nich byl pyl vysypán a hodnocen. Je pravděpodobné, že se ze suchých prašníků lépe dostával těžší viabilní pyl a neviabilní scvrklá a poškozená zrna zůstávala uvnitř, a proto byl suchý pyl zdánlivě životaschopnější. Těmto nesrovnalostem by bylo možné předejít tím, že se prašníky vyprázdní a usuší se jen samotný pyl. Na viabilitu hodnoceného pylu neměl vliv jeho původ a stav.

Klíčivost pylu u všech hodnocených genotypů byla 0 %. Tento výsledek odpovídá výsledkům, které ve své práci uvádí Yermishin a kol. (2006), který tvrdí, že klíčivost všech

somatických hybridů *Solanum tuberosum* x *Solanum bulbocastanum* byla nízká a na pěstebním médiu vyklíčilo pouze 0 – 1 % pylových zrn. Problémem může být fakt, že 0% klíčivost vykazovaly i genotypy využívané v této práci jako referenční, u kterých byla předpokládána bezproblémová fertilita a pomocí barvení acetokarmínem zjištěna vysoká viabilita čerstvého i suchého pylu. Tento rozdíl mohl být, jak uvádí Kovalczyk (2008), způsoben tím, že zjišťování fertility pomocí barvení pylu acetokarmínem vykazuje výrazně vyšší výsledky. Nicméně, tato metoda hodnocení pylu byla kritizována za to, že se výsledky liší od jeho skutečné fertility.

Somatické hybridní rostliny hodnocené v této práci byly původně vytvořeny pro výzkum probíhající na Katedře genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze, který se zabýval vlivem křížení *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* a *Solanum bulbocastanum* na výskyt plísně bramborové (*Phytophthora infestans*). Výsledky tohoto výzkumu prokázaly vysokou odolnost těchto hybridních genotypů k plísni bramborové, z tohoto hlediska tedy mají šlechtitelský potenciál.

Dle Waara a Glimelius (1995) obecně platí, že rostliny vytvořené somatickou hybridizací vykazují nízkou fertilitu pylu. Přesto mohou být tyto rostliny využity jako samičí rodičovští partneři ve zpětném křížení s kulturními druhy bramboru, i když samčí fertilita může být také nízká. Dle mého názoru je toto využití vhodné pro genotypy hybridních rostlin hodnocených v této práci. Ovšem pouze za předpokladu zjištění samičí fertility. Jelikož viabilita pylu hodnocených rostlin nedosahovala hodnot vyšších než 6 %, je velmi malá pravděpodobnost jejich dalšího využití ve šlechtění bramboru jako samčích rodičovských partnerů.

7. ZÁVĚR

Závěry vyplývající z této práce je možné shrnout do několika bodů:

- Způsob pěstování rostlin nemá vliv na viabilitu pylu.
- Suchý pyl vykazoval vyšší viabilitu než pyl čerstvý, pravděpodobně kvůli způsobu jeho sušení. Proto by bylo vhodnější místo celých prašníků sušit jen samotný pyl.
- Hodnocené genotypy vykazovaly výrazně nižší viabilitu pylu než nekulturní druhy rodu *Solanum* využité jako kontrolní genotypy.
- Viabilita čerstvého i suchého pylu hodnocených hybridních genotypů rostlin (*Solanum tuberosum* x *Solanum bulbocastanum*) byla nižší než 6 %, jejich pyl je tedy téměř sterilní.
- Klíčivost pylu všech hodnocených genotypů byla 0 %.
- Přestože vykazují velmi nízkou fertilitu pylu, mohou být tyto rostliny využity jako samičí rodičovští partneři ve zpětném křížení s kulturními druhy bramboru. Ovšem jejich fertilita může být v tomto směru také nízká. Pravděpodobnost jejich dalšího využití ve šlechtění bramboru jako samčích rodičovských partnerů je velmi malá.

8. SEZNAM LITERATURY

Ancora, G., Sonnino, A. 1987. In Vitro Induction of Mutation in Potato. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). 1987. Potato. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 408-424. ISBN: 3-540-17966-6.

Bajaj, Y. P. S. 1987a. Biotechnology and 21st Century Potato. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). 1987. Potato. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 3-22. ISBN: 3-540-17966-6.

Bajaj, Y. P. S. 1987b. Cryopreservation of Potato Germplasm. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). 1987. Potato. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 472-486. ISBN: 3-540-17966-6.

Barnabás, B., Kovács, G. 1997. Storage of pollen. In: Shivanna, K., R., Sawhney, V., K. (eds.). 1997. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press. New York. s. 293-314. ISBN: 05-214-7180-X.

Cardi, T. 2001. Somatic Hybridization Between *Solanum Commersonii* Dun. and *Solanum tuberosum* L. (Potato). In: Nagata, T., Bajaj, Y. P. S. (eds.). 2001. Somatic Hybridization in Crop Improvement II. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 264-274. ISBN: 3-540-41112-7.

Cardi, T., D'Ambrosio, F., Consoli, D., Puite, K. J., Ramulu, K. S. 1993. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. Theoretical and Applied Genetics. 87 (1-2). s. 193-200.

Ehlenfeldt, M. K., Helgeson, J. P. 1987. Fertility of somatic hybrids from protoplast fusions of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. Theoretical and Applied Genetics. 73 (3). s. 395-402.

Greplová, M., Horáčková, V. 2000. Využití somatické hybridizace ve šlechtění bramboru. Bramborářství. 8 (2). s. 14-15.

Greplová, M., Greplová, E., Polzerová, H., Domkářová, J. 2010. Metodika asymetrické somatické hybridizace (u rodu *Solanum tuberosum*). In: Čermák, V., Lízal, P., Procházková, J.

- (eds.). 2010. Metodické postupy využitelné ve šlechtění II. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. Havlíčkův Brod. s. 13-27. ISBN: 978-80-86940-26-7.
- Horáčková, V., Domkářová, J. 1998. Konzervace „in vitro“, její uplatnění u kolekce brambor. In: Faberová, I., Holubec, V. (eds.). 1998. Metody konzervace genofondu rostlin a možnosti jejich využití v ČR. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně. Praha. s. 66-73. ISBN: 80-238-3569-6.
- Hruška, L. 1974. Brambory. SZN. Praha. 416 s.
- Chloupek, O. 2000. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha. 311 s. ISBN: 80-200-0779-2.
- Kowalczyk, K., Kobryń, J., Zieliński, W. 2008. Evaluation of pollen fertility in pepino (*Solanum muricatum* Ait.). *Folia horticultrae*. 20 (1). s. 43-59.
- Li, Y. – G., Stoutjestijk, P., A., Larkin, P., J. 1999. Somatic hybridisation for plant improvement. In: Soh, W., Bhojwani, S., S. (eds.). 1999. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. s. 363-418. ISBN: 0-7923-5682-9.
- Millam, S., Davie, P. 2001. Somatic Hybridization Between *Solanum tuberosum* L. (Potato) and *Solanum phureja*. In: Nagata, T., Bajaj, Y. P. S. (eds.). 2001. Somatic Hybridization in Crop Improvement II. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 264-274. ISBN: 3-540-41112-7.
- Richards, A. J. 1997. Plant Breeding Systems. 2nd ed. Chapman & Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 529 s. ISBN: 0-412-57440-3.
- Shivanna, K., R., Sawhney, V., K. 1997. Pollen biology and pollen biotechnology: an introduction. In: Shivanna, K., R., Sawhney, V., K. (eds.). 1997. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press. New York. s. 1-11. ISBN: 05-214-7180-X.
- Slavík, B. (ed.). 2000. Květena české republiky 6. Academia. Praha. 660 s. ISBN: 80-200-0306-1.

- Tomšovic, P. 2000. *Solanum tuberosum* L. – lilek brambor, brambor obecný. In: Slavík, B. (ed.). 2000. Květena české republiky 6. Academia. Praha. s. 274–275. ISBN: 80–200–0306–1.
- Trognitz, B. R. 1991. Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. *Euphytica*. 56 (2). s. 143-148.
- Waara, S., Glimelius, K. 1995. The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*. 85 (1-3). s. 217-233.
- Wang, Z. -Y., Ge, Y., Scott, M., Spangenberg, G. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (*Poaceae*) plants. *American Journal of Botany*. 91 (4). s. 523–530.
- Yermishin, A. P., Makhan'ko, O. V., Voronkova, E. V. 2006. Application of Somatic Hybrids between Dihaploids of Potato *Solanum tuberosum* L. and Wild Diploid Species from Mexico in Breeding: Generation and Backcrossing of Dihaploids of Somatic Hybrids. *Russian Journal of Genetics*. 42 (12). s. 1414–1421.
- Zadina, J., Jermoljev, E. 1976. Šlechtění bramboru. Academia. Praha. 360 s.