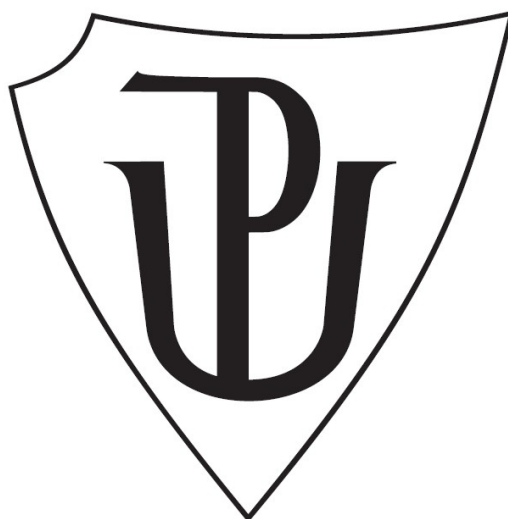


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra botaniky



***IN VITRO* MIKROPROPAGACE A PROTOPLASTOVÉ KULTURY U
VYBRANÝCH DRUHŮ ČELEDI FABACEAE**

Diplomová práce

Bc. Michal Knitl

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Učitelství biologie - geologie a ochrany životního prostředí pro střední školy

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: RNDr. Božena Navratilova, Ph.D.

**Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, s pomocí vedoucí práce
a s využitím uvedené literatury a zdrojů.**

V Olomouci dne

Podpis:.....

Na tomto místě bych rád poděkoval především RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. za její neutuchající trpělivost a pomoc při zpracovávání této diplomové práce a Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za jeho odborné rady.

Diplomová práce byla podpořena grantem IGA PřF-2015-001.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Michal Knitl

Název práce: *In vitro* mikropropagace a protoplastové kultury u vybraných druhů čeledi fabaceae

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky

Vedoucí práce: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Cílem diplomové práce bylo stanovit vhodné postupy pro mikropropagaci a protoplastové kultury 6 genotypů - *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus neurolobus* 20080542, *Pisum fulvum* WL 2140 a *Pisum elatius* JI 1794. Pro účely povrchové sterilizace byly použity komerční přípravky chloramin B (2,5% a 5%) a SAVO (36%). Pro zkrácení internodií byl testován Alar 85 (1,5 mg/l) a médium OK100 (1 mg/l BAP; 1 mg/l IBA). Jako bazální médium bylo při mikropropagaci použito médium MS doplněné růstovými regulátory. Kontrolním médiem bylo médium OK (0,01 mg/l BAP; 0,01 mg/l IBA). V multiplikační fázi mikropropagace byla u genotypů *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Pisum fulvum* WL 2140 a *Pisum elatius* JI 1794 použita média B1 (1 mg/l BAP), B2 (2,5 mg/l BAP), B5 (5 mg/l BAP) a B10 (10 mg/l BAP). Nejlepší zmnožení bylo u genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01 na médiu B5 (3,7 na explantát). Při izolaci protoplastů genotypů *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Pisum elatius* JI 1794 byly testovány enzymatické roztoky ENZ 1 (1% celulóza R-10; 0,1% pektolyáza Y-23; 0,3% macerozym R-10), ENZ 2 (1% celulóza R-10; 0,1% pektolyáza Y-23; 0,9% macerozym R-10) a ENZ 3 (2% celulóza R-10; 0,1% pektolyáza Y-23; 1,5% macerozym R-10). U enzymatického roztoku ENZ 2 zvýšila preplazmolýza hustotu (o 2,63 – 3,24 x 10⁵ protoplastů na 1 ml média) a životnost protoplastů (o 29,63 – 33,92 %). Jako plazmolytické a promývací roztoky byly použity PGly a CPW13. Pro stanovení optimální doby působení enzymatického roztoku byly

testovány časy 14 h, 16 h a 18 h. Pro kultivaci získaných protoplastů byla testována média Y (2 mg/l BAP; 1 mg/l 2,4-D; 1 mg/l glutaminu) a Z (1 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA) s bazálním médiem MS doplněným o 90 g/l mannitolu a 30 g/l sacharózy.

Klíčová slova: mikropropagace, *Lathyrus spp.*, *Pisum spp.*, *Fabaceae*, protoplastové kultury

Počet stran: 70

Počet příloh: 13

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Michal Knitl

Title: *In vitro* micropropagation and protoplast cultures of selected species of family Fabaceae

Type of thesis: master

Department: Department of botany

Supervisor: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: The aim of this master thesis was to define appropriate proceedings for micropropagation and protoplast cultures of 6 genotypes - *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus neurolobus* 20080542, *Pisum fulvum* WL 2140 and *Pisum elatius* JI 1794. For surface sterilization were tested a commercial agents chloramin B (2,5% a 5%) and SAVO (36%). Influence of growth retardant Alar 85 (1,5 mg/l) and medium OK100 (1 mg/l BAP; 1 mg/l IBA) for reduction of length of explants internode. As basal medium for micropropagation was used MS medium supplemented with growth regulators. Medium OK (0,01 mg/l BAP; 0,01 mg/l IBA) was used as control. In multiplication stage of the micropropagation were used media B1 (1 mg/l BAP), B2 (2,5 mg/l BAP), B5 (5 mg/l BAP) and B10 (10 mg/l BAP) for explants of genotypes *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Pisum fulvum* WL 2140 and *Pisum elatius* JI 1794. Best result was obtained for genotype *Lathyrus clymenum* NS-01 on médium B5 (3,7 for explant). Enzymatic sotions ENZ 1 (1% celuláza R-10 ; 0,1% pektolyáza Y-23; 0,3% macerozym R-10), ENZ 2 (1% celuláza R-10 ; 0,1% pektolyáza Y-23; 0,9% macerozym R-10) and ENZ 3 (2% celuláza R-10 ; 0,1% pektolyáza Y-23; 1,5% macerozym R-10) were tested for protoplast isolation of genotypes *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371 and *Pisum elatius* JI 1794. Influence of preplasmolysis on density (was higher for $2,63 - 3,24 \times 10^5$ protoplasts) and lifespan (was higher for 29,63 – 33,92 %) of protoplasts with use of enzymatic solution ENZ 2 was tested. As plazmolytic and washing solutions were

used PGly and CPW13. Optimization of enzymatic solution influence time was tested with times 14 h, 16 h and 18 h. For cultivation of protoplasts were tested media (2 mg/l BAP; 1 mg/l 2,4-D; 1 mg/l glutamin) and Z (1 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA) based on basal medium MS supplemented with 90 g/l mannitol and 30 g/l sucrose.

Keywords: micropropagation, *Lathyrus spp.*, *Pisum spp.*, *Fabaceae*, protoplast cultures

Number of pages: 70

Number of appendices: 13

Language: czech

Obsah

Seznam zkratek	11
1 Úvod	12
2 Cíle diplomové práce	14
3 Současný stav řešené problematiky	15
3.1 Mikropropagace rostlin	15
3.1.1 Rostlinný materiál a povrchová sterilizace explantátů	15
3.1.2 Kultivace explantátů	15
3.1.3 Převod do prostředí <i>ex vitro</i>	15
3.2 Mikropropagace bobovitých (<i>Fabaceae</i>) se zaměřením na rody hrách (<i>Pisum</i> sp.) a hrachor (<i>Lathyrus</i> sp.)	16
3.2.1 Rostlinný materiál	16
3.2.2 Povrchová sterilizace explantátů	16
3.2.3 Klíčení semen	17
3.2.4 <i>In vitro</i> propagace	19
3.3 Izolace protoplastů u bobovitých (<i>Fabaceae</i>)	24
3.4 Zařazení čeledi <i>Fabaceae</i> do systému vyšších rostlin (dle Cronquist 1988)	26
3.4.1 Charakteristika čeledi <i>Fabaceae</i> (bobovité)	26
3.4.2 Charakteristika rodu <i>Pisum</i> – hrách	27
3.4.3 Charakteristika rodu <i>Lathyrus</i> – hrachor	28
3.4.4 Charakteristika vybraných druhů čeledi <i>Fabaceae</i>	28
3.4.4.1 <i>Lathyrus neurolobus</i>	28
3.4.4.2 <i>Lathyrus clymenum</i> – hrachor popínavý	29
3.4.4.3 <i>Lathyrus ochrus</i> – hrachor žlutoplodý	30
3.4.4.4 <i>Pisum fulvum</i>	31
3.4.4.5 <i>Pisum sativum</i> subsp. <i>elatius</i> (syn. <i>Pisum elatius</i>) – hrách setý	32
4 Materiál a metody	33
4.1 Rostlinný materiál	33
4.2 Chemikálie a roztoky	34
4.3 Použité vybavení	35
4.4 Povrchová sterilizace a klíčení semen	36

4.4.1 Oživování semen	37
4.5 Mikropropagace	37
4.5.1 Kultivační média	37
4.5.2 Pasážování a kultivace	38
4.5.3 Hodnocení mikropropagace	38
4.6 Izolace, purifikace a kultivace protoplastů	39
4.6.1 Rostlinný materiál pro protoplastové kultury	39
4.6.2 Enzymatické roztoky	39
4.6.3 Izolace a purifikace protoplastů	39
4.6.3.1 Pracovní postup při použití enzymatického roztoku ENZ 1	40
4.6.3.2 Pracovní postup při použití enzymatických roztoků ENZ 2 a ENZ 3	40
4.6.4 Vliv preplazmolýzy	41
4.6.5 Stanovení hustoty a životnosti protoplastů	41
4.6.6 Kultivace protoplastů	42
5 Výsledky	43
5.1 Povrchová sterilizace semen	43
5.2 <i>In vitro</i> propagace	45
5.2.1 Vliv BAP na vývoj explantátů	46
5.2.2 Vliv Alaru 85 a koncentrace hormonů v médiu na délku internodií	50
5.2.3 Vliv antibiotik v kultivačním médiu OKatb na vývoj explantátů	51
5.3 Izolace a kultivace protoplastů	51
5.3.1 Vliv cefotaximu na bakteriální kontaminace	52
5.3.2 Vliv doby působení enzymatického roztoku	52
5.3.3 Vliv složení enzymatického roztoku a izolačního postupu	52
5.3.4 Vliv preplazmolýzy	53
5.3.5 Kultivace protoplastů	53
6 Diskuze	55
6.1 Povrchová sterilizace a klíčení semen	55
6.2 Mikropropagace	56
6.3 Izolace a kultivace protoplastů	58

7 Závěr	64
8 Použitá literatura	63
Přílohy	71

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
ABA	kyselina abscisová
B5	kultivační médium dle Gamborg a kol. 1968
BAP	6-benzylaminopurin
BM	kultivační médium dle Blaydes 1966
FDA	fluorescein diacetát
GA ₃	giberelová kyselina
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
KN	kinetin
LS	kultivační médium dle Linsmaier a Skoog 1965
MS	kultivační médium dle Murashige a Skoog 1962
MSB	kultivační médium složené z bazálních solí MS a vitamínů B5
NAA	α -naftyloctová kyselina
PPM	Plant Preservative Mixture
SDS	dodecylsírán sodný
SH	kultivační médium dle Schenk a Hildebrandt 1972
TDZ	thidiazuron
W	kultivační médium dle White 1963
ZEA	zeatin

1 Úvod

Čeď bobovítých (*Fabaceae*) je třetí největší čeďí cévnatých rostlin. Její zástupci jsou pěstováni na 12 - 15 % světové orné půdy a tvoří přibližně 27 % světové primární produkce plodin. Mnoho zástupců čeďi, jako je čočka jedlá (*Lens culinaris*), hrách setý (*Pisum sativum*), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), sója luštinatá (*Glycine max*) a jiné, je pěstováno jako zdroj potravy. Jejich semena obsahují velké množství bílkovin a esenciálních aminokyselin, jsou dobrým zdrojem železa, fosforu, zinku a dalších důležitých prvků, vitamínů a jsou bohaté na vlákninu. Jejich význam roste především v rozvojových zemích, kde jsou hlavním a občas i jediným zdrojem právě bílkovin a esenciálních aminokyselin, ale jsou také kvalitním zdrojem sacharidů pro lidi trpící cukrovkou (Khan a kol. 2010; Franklin a kol. 2000).

Zástupci bobovítých (*Fabaceae*) nejsou jen kvalitním zdrojem potravin pro člověka, ale své využití nacházejí i jako krmivo pro zvířata (Henry a kol. 2012), mohou být využívány jako fytoindikátoři čistoty ovzduší (Duro a kol. 2012), pícniny a zelená hnojiva, nebo okrasné rostliny (Schaefer a kol. 2012).

Přes široké spektrum variet různých druhů vytváří poptávka, způsobená rostoucím počtem obyvatelstva v rozvojovém světě a klesajícím objemem půdního fondu, velký tlak na vědecké úsilí při šlechtění nových a kvalitnějších odrůd (Khan a kol. 2010). Hlavními cíly při šlechtění je zvýšení výnosu, zlepšení výživových hodnot, rezistence k herbicidům, škůdcům a odolnost proti chorobám (Franklin a kol. 2000). Toho je možné dosáhnout například křížením s příbuznými planými druhy (Smýkal a kol. 2011; Mikić a kol. 2013), křížením s tropickými druhy (Franklin a kol. 2000) nebo indukovanou mutagenézou (Supe a Roymond 2011; Barik a kol. 2004).

Klasické metody množení rostlin jsou časově, finančně i prostorově náročné (Franklin a kol. 2000). Vhodnou alternativou jsou *in vitro* metody propagace, pomocí kterých je možné produkovat každoročně velká množství rostlin při využití mnohem menších prostor než při klasickém množení. Metody *in vitro* propagace jsou součástí rostlinných biotechnologií, které jsou vhodným doplňkem konvenčních metod šlechtění. Ve šlechtění lze využít:

- 1) meristémové kultury – selekce *in vitro*, dlouhodobé skladování genetických zdrojů (Smýkal a kol. 2007), ozdravování rostlinného materiálu, somatická embryogeneze, indukce mutagenézy (Supe a Roymond 2011; Griga 1990)

- 2) elektroforetickou analýzu zásobních proteinů – odlišení genotypů a kontrola úspěšnosti křížení (Šuška a Stejskal 1992; Šuška 1993; Kubánek 1996)
- 3) molekulární metody, techniky rekombinace DNA a metody genového inženýrství – konstrukce GMO rostlin s potřebnými znaky a vlastnostmi (Hochman a Hosnedl 1997)
- 4) protoplastové kultury – tvorba hybridů pomocí fúze protoplastů (Wiszniewska a Pindel 2010, Ochatt a kol. 2001)

2 Cíle diplomové práce

Diplomová práce je zaměřena na využití explantátových kultur rostlin rodů hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.). Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Studium odborné literatury a její zpracování do přehledné literární rešerše shrnující aktuální poznatky z oblastí mikropropagace, izolace protoplastů a kultivace protoplastových kultur čeledi bobovité (*Fabaceae*) se zvláštním zaměřením na rody hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.).
2. Na základě prostudované literatury navrhnout potenciálně vhodné materiály a metody pro mikropropagaci, izolaci protoplastů a kultivaci protoplastových kultur rodů hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.).
3. Stanovení vhodného postupu při zakládání aseptické kultury ze semen genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus neurolobus* 20080542.
4. Optimalizace kultivačních médií *in vitro* pro množení rostlinného materiálu genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus ochrus* ATC81371.
5. Optimalizace metod pro izolaci protoplastů u genotypů tří genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus ochrus* ATC81371.
6. Zpracování získaných výsledků a fotodokumentace.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Mikropropagace rostlin

Mikropropagace rostlin představuje soubor technik, pomocí kterých je možné pěstovat a množit v aseptickém prostředí a za přesně definovaných podmínek izolované části rostlin. Tyto techniky jsou také nazývány jako metody *in vitro* (Kováč 1995).

Základním předpokladem pro vypěstování nové rostliny z jednotlivých orgánů, pletiv nebo jen z jediné samostatné buňky, je vysoká totipotentní schopnost rostlinných buněk. To znamená, že za příznivých podmínek jsou tyto buňky schopny dediferencovat se do základního tvaru a vlivem podnětů ze svého okolí se opět začít dělit a dát tak vzniknout novému pletivu (Novák 1990).

3.1.1 Rostlinný materiál a povrchová sterilizace explantátů

Prvním krokem při zakládání *in vitro* kultury je odběr vhodného materiálu - explantátu - z matečné rostliny. Mohou jím být různé části rostlinného těla, jako jsou nodální segmenty, vzrostné vrcholy, stonkové řízky, části kořenů, listů, nezralá pylová zrna a vajíčka, nezralá embrya nebo semena. Dále následuje povrchová sterilizace odebraného materiálu ponořením do sterilizačního roztoku, aby se explantát zbavil všech patogenů a jejich zárodků, které by byly jinak přeneseny spolu s explantátem do kultivačního média. Je důležité, aby koncentrace sterilizačního roztoku a doba jeho působení byly vyvážené, aby nedocházelo k poškození explantátu. Ten je následně promýván ve sterilní destilované vodě, aby se zbavil zbytků sterilizačního roztoku ze svého povrchu (Pierik 1987).

3.1.2 Kultivace explantátů

Po povrchové sterilizaci je explantát převeden do kultivačního média, které je obvykle zpevněno pomocí agaru nebo jiného vhodného prostředku. Kultivační médium obsahuje bazální soli, vitamíny, cukry a podle jeho účelu rostlinné hormony a pomocné látky (např. kyselinu askorbovou, kokosové mléko nebo kasein hydrolyzát). Podle použitých hormonů a jejich koncentrací může docházet k tvorbě pupenů, větvení výhonků, prolongaci výhonků a jejich kořenění nebo k tvorbě kalusu. Takto získaný rostlinný materiál je pak možné použít při šlechtění nových druhů dalšími specializovanými technikami.

3.1.3 Převod do prostředí *ex vitro*

Nakonec je potřeba převést namnožené rostlinky do prostředí *ex vitro*,

tedy do běžných nesterilních podmínek. Zde je potřeba postupovat opatrně, protože *in vitro* pěstované rostliny nemají vytvořenou kutikulu. Nejprve se tedy provádí snižování relativní vzdušné vlhkosti v kultivační nádobě. Toho lze docílit použitím potravinářské folie jako uzávěru. Teprve po vytvoření kutikuly mohou být rostliny vyjmuty z kultivačních nádob, důkladně očištěny od zbytků kultivačního média a přeneseny do vhodného substrátu (Hradilík 2005).

3.2 Mikropropagace bobovitých (*Fabaceae*) se zaměřením na rody hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.)

3.2.1 Rostlinný materiál

U čeledi bobovitých (*Fabaceae*) bylo provedeno mnoho studií *in vitro* regenerace, při kterých byly použity jako explantáty různé části rostlin. U hrachu setého (*Pisum sativum*) šlo o děložní nody (Rajput a Singh 2010), dělohy (Pniewsky a kol. 2003), nezralá embrya (Kosturkova a kol. 1997), mladé listy (Fujioka a kol. 2000) nebo vzrostné vrcholy (Griga a kol. 1986). U rodu hrachor (*Lathyrus* sp.) bylo jako explantátů použito nezralých embryí (Sahin-Demirbag a kol. 2008), děložních nodů (Malik a kol. 1992; Barik a kol. 2004), děloh, hypokotylů, epikotylů, internodií a listů (Barik a kol. 2005). Nejčastějším zdrojem explantátů pro zakládání *in vitro* kultur používaných jak u rodu hrách (*Pisum* sp.) (Espósito a kol. 2012; Zhihui a kol. 2009; Tzitzikas a kol. 2004; Franklin a kol. 2000), tak u rodu hrachor (*Lathyrus* sp.) (Barik 2004, 2005; Klčová a Gubišová 2003; Saglam 2012; Sahin-Demirbag a kol. 2008; Tripathy a kol. 2014) jsou zralá semena.

3.2.2 Povrchová sterilizace explantátů

Při použití semen jako explantátu se může provádět nejprve skarifikace osemení, aby se tak usnadnilo jeho prorážení embryem, nebo zlepšila bobtnavost a zvýšila se tím klíčivost semen. Za tímto účelem se u bobovitých (*Fabaceae*) používá koncentrovaná kyselina sírová s velmi rozdílnou dobou působení (1-15 min) (Franklin a kol. 2000; Klčová a Gubišová 2003; Malik a kol. 1992). Klčová a Gubišová (2003) uvádějí nárůst klíčivosti semen hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*) při ošetření kyselinou sírovou o 30-60% koncentraci, v závislosti na genotypu a substrátu, na kterém semena klíčí.

Před samotnou sterilizací se semena často promývají pod tekoucí vodou a vystavují se působení 70% nebo 96% ethanolu jakožto presterilizačního roztoku po dobu 0,5-2 min

(Klčová a Gubišová 2003; Tripathy a kol. 2014; Tzitzikas a kol. 2004; Zhihui a kol. 2009). Místo ethanolu se také používá 1-8% roztok komerčního biologicky odbouratelného detergentu Teepol, jehož doba působení se pohybuje mezi 3-5 min (Barik a kol. 2004, 2005; Supe a Roymon 2011).

Jako sterilizační roztok se u semen hrachu (*Pisum* sp.) a hrachoru (*Lathyrus* sp.) nejčastěji používají 0,1-1% chlorid rtuťnatý (HgCl_2) (Barik a kol. 2004, 2005; Klčová a Gubišová 2003; Supe a Roymon 2011) s dobou působení mezi 2-10 min nebo 0,5-25% chlornan sodný (NaOCl) (Saglam 2012; Tzitzikas a kol. 2004; Zhihui a kol. 2009, Espósito a kol. 2012) s dobou působení mezi 10-20 min. Tripathy a kol. (2014) použili k povrchové sterilizaci směs chlornanu sodného s Teepolem v poměru 7:3 s přídatkem 0,1 % chloridu rtuťnatého. Pokud nebyl jako presterilizační roztok použit Teepol, může se přímo do sterilizačního roztoku přidat několik kapek detergentu Tween20 pro lepší smáčivost (Klčová a Gubišová 2003; Malik a kol. 1992). Franklin a kol. (2000) použili jako detergent do sterilizačního roztoku 0,1% dodecylsírán sodný (SDS).

3.2.3 Klíčení semen

Samotnému klíčení semen mohou předcházet dva procesy - skarifikace a bobtnání. Oba tyto procesy mohou významně ovlivnit klíčivost semen. Tripathy a kol. (2014) uvádí, že semena, která do sebe vstřebala dostatečné množství vody, mají obecně velmi dobrý předpoklad k vyklíčení, ale za předpokladu, že médium použité ke klíčení je vhodné k oživení embrya.

Obecně se při klíčení semen bobovitých používá:

1. vlhký filtrační papír
2. média MS (Murashige a Skoog 1962), B5 (Gamborg a kol. 1968), případně médium složené z bazálních solí MS a B5 vitamínů (MSB).

Pro zpevnění média se téměř výhradně používá agar, jen Malik a kol. (1992) použili ve své práci místo agaru gelrit. Není ovšem známo, že by zpevňující složka měla jakýkoli vliv na klíčení semen.

Rozdíl v klíčivosti semen hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*) klíčených na filtračním papíru a na MS médiu sledovaly Klčková a Gubišová (2003), přičemž došly k závěru, že použitím MS média lze významně pozitivně ovlivnit klíčivost. Rozdíl v klíčivosti při použití média MS nebo filtračního papíru byl větší mezi semeny, která před klíčením

neprodělala skarifikaci kyselinou sírovou (Tab. 1).

Vliv bazálního média na klíčivost semen hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) studovali Tripathy a kol. (2014), kteří srovnávali média MS a B5, přičemž klíčivost na MS médiu byla výrazně lepší. Rovněž se zaměřili na vliv koncentrace bazálního média na klíčivost. Ta byla u obou zkoumaných médií nejlepší při poloviční koncentraci složek média.

Tab. 1: Přehled používaných postupů při klíčení semen bobovitých (*Fabaceae*)

genotyp	bobtnání v H ₂ O	skarifikace	médium	zpevňující látka	fytohormony	klíčivost (%)	zdroj
<i>Lathyrus sativus</i>	-	ne	MS	agar	-	-	Barik a kol. 2005
<i>Lathyrus cicera</i> , <i>Lathyrus ochrus</i> , <i>Lathyrus sativus</i>	-	ano	MSB	gelrit	-	75-80	Malik a kol. 1992
					BAP 11mg/l	75-80	
<i>Lathyrus sativus</i>	1-2 h	ne	1/2 MS	agar	-	97	Tripathy a kol. 2014
			MS			69	
			1/2 B5			39	
			B5			18	
<i>Lathyrus pratensis</i> GR28	24 h	ne	H ₂ O	filtrační papír	-	0-10	Klčková a Gubišová 2003
		ano				90	
		ne	MS	54			
		ano		94			
<i>Lathyrus pratensis</i> GR62		ne	H ₂ O	filtrační papír		0-10	
		ano				72	
		ne	MS	40			
		ano		100			
<i>Lathyrus ochrus</i>	-	ne	MS	agar	-	-	Saglam 2012
<i>Pisum sativum</i>	-	ne	MS	agar	BAP, KN	-	Supe a Roymon 2011
<i>Pisum sativum</i>	36 h	ne	MS	agar	-	-	Tzitzikas a kol. 2004
<i>Pisum sativum</i>	18 h	ano	MS	agar	-	-	Franklin a kol. 2000
<i>Pisum sativum</i>	-	ne	MS	agar	TDZ 0, 2, 4, nebo 8 mg/l	-	Zhihui a kol. 2009
<i>Pisum sativum</i>	-	ne	MS	agar	BAP 6, 11 nebo 17 mg/l	-	Espósito a kol. 2012
			MSB				

U média MS zkoumali Tripathy a kol. (2014) i nižší koncentrace (až do 1/10), ale klíčivost na nich byla nižší a klesala i rychlost klíčení. Oproti tomu Kysely a Jacobsen (1990) dosáhly dobré klíčivosti u hrachu setého (*Pisum sativum*) i na 1/10 MS médiu a Gulati a Jaiwal (1990) při klíčení semen vigny zlaté (*Vigna radiata*) na médiích MS, B5 a MSB nezaznamenali žádný rozdíl v klíčivosti.

Podle Supe a Roymon (2011) lze klíčivost zvýšit také pomocí přiměřených dávek gama záření. U hrachu setého (*Pisum sativum*) dostáhli zvýšení klíčivosti při dávce 180 Gy. Gama záření zároveň způsobovalo náhodné mutace v genetické výbavě testovaných jedinců.

3.2.4 *In vitro* propagace

Organogeneze v podmínkách *in vitro* se rozlišuje přímá a nepřímá. Při přímé organogenezi se nové výhony regenerují přímo z použitého explantátu (Ochatt a kol. 2013; Espósito a kol. 2012; Zhihui a kol. 2009). Při nepřímé se nejprve z použitého explantátu vytváří kalusová kultura a teprve z ní se regenerují nové výhonky (Tripathy a kol. 2014; Sharma a kol. 2004).

Rozdíly v reakci na množení v podmínkách *in vitro* jsou dány především pěti základními faktory - genotypem, druhem explantátu, médiem, zpevňující látkou, typem a koncentrací fytohormonů v médiu.

Vliv genotypu na propagaci sledovali u různých druhů hrachoru (*Lathyrus* sp.) a jejich genotypů Ochatt a kol. (2013). Za stejných podmínek rostly explantáty nejlépe na médiích o rozdílném složení fytohormonů a jejich koncentrací nejen v rámci rozdílných druhů, ale také v rámci rozdílných genotypů téhož druhu (Tab. 2). Rozdíly složení optimálního kultivačního média v rámci různých genotypů téhož druhu byly menší, než u rozdílných druhů.

Tab. 2: Optimální složení fytohormonů pro propagaci vybraných druhů hrachoru (*Lathyrus* sp.) a jejich genotypů na médiu MSB dle Ochatt a kol. (2013)

genotyp	explantát	fytohormony	kultivační podmínky
<i>Lathyrus sativus</i> L156	hypokotyl	BAP 1 mg/l	22±2°C, fotoperioda 16/8h
	děloha		
<i>Lathyrus sativus</i> L180	hypokotyl	BAP 1 mg/l, NAA 0,5 mg/l	
		TDZ 2,2 mg/l	
	děloha	BAP 1 mg/l, NAA 0,1 mg/l	
<i>Lathyrus ochrus</i> L352	hypokotyl	ZEA 10 mg/l, ABA 1 mg/l	

K obdobným výsledkům došli i Espósito a kol. (2012), kteří sledovali rozdíly v propagaci celkem u pěti kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum*) a Tzitzikas a kol. (2004), kteří sledovali rozdíly v propagaci u dvou kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum*). Optimálnost jednotlivých testovaných médií byla u různých kultivarů stejná (Espósito a kol. 2012), ale explantáty se výrazně lišily svým zmožením (Tab. 3).

Ochatt a kol. (2013) se ve své práci věnovali také použití různých typů explantátů (Tab. 2). Při použití dělohy nebo hypokotyly jako explantátů regeneroval za stejných podmínek lépe hypokotyl než děloha, nebo byly výsledky srovnatelné. Z toho lze vyvodit, že u rodu hrachor (*Lathyrus* sp.) je obecně výhodnější používat při přímé organogenezi jako explantát hypokotyl než dělohu.

Tab. 3: Srovnání růstu semen různých kultivarů hrachu setého (*Pisum sativum*) po 4 týdnech kultivace na médiu MSB dle Espósito a kol. (2012)

kultivar	koncentrace BAP (mg/l)	Ø počet prýtů/explantát
C2001	5	17
	10	11,43
Canada A	5	8,17
	10	6,86
Viper	5	31,5
	10	22,5

Ke stejným výsledkům dospěli i Franklin a kol. (2000), kteří sledovali reakci děložních nodů a vzrostných vrcholů hrachu setého (*Pisum sativum*) na kultivační média s různou koncentrací fytohormonů. Vhodnost jednotlivých médií byla pro oba typy explantátů srovnatelná, ale děložní nody vytvářely na všech médiích mnohem více výhonků, než vzrostné vrcholy (Tab. 4). Počet výhonů u obou typů explantátů rostl se zvyšující se koncentrací BAP až do koncentrace 2 mg/l.

Obecně nejpoužívanějším zdrojem explantátů při přímé organogenezi bobovitých (*Fabaceae*) jsou buď semena, nebo nodální segmenty z *in vitro* rostoucích rostlin (Barik a kol. 2004, 2005; Espósito a kol. 2012; Khan a kol. 2010; Saglam 2012; Tzitzikas a kol. 2004; Zhihui a kol. 2009)

Tab. 4: Srovnání regenerace děložních nodů a vzrostných vrcholů hrachu setého (*Pisum sativum*) při různých koncentracích BAP dle Franklin a kol. (2000)

explantát	koncentrace BAP v mg/l	Ø počet prýtlů/explantát
děložní nod	0,5	4
	1	25
	2	32
	5	13
vzrostný vrchol	0,5	0
	1	5
	2	7
	5	0

Pro nepřímou organogenezi hrachu setého (*Pisum sativum*) cv. Lincoln testovali tři druhy explantátů při indukci tvorby kalusu Sharma a kol. (2004) (Tab. 5). Nejvhodnějším explantátem se v tomto případě ukázal být epikotyl. Jen na médiu MS byl o málo produktivnějším explantátem list.

Ve stejné studii (Sharma a kol. 2004) je patrný i vliv bazálního média na regeneraci kalusu, kdy jako optimální se jeví média MS a B5. Obdobnou studii provedli i Tripathy a kol. (2014), ovšem pro hrachor setý (*Lathyrus sativus*). Zde se jako nejlepší bazální média pro tvorbu kalusu ukázala být média B5 a BM (Blaydes 1966).

Vliv média na přímou organogenezi u hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*) studovaly Klčová a Gubišová (2003). Z médií MS, MSB a B5 tvořily explantáty nejvíce výhonků na médiu MS a nejméně na médiu B5. Jako optimální se ukázalo bazální médiu MS i pro hrachor setý (*Lathyrus sativus*) v práci Barik a kol. (2004). MS médium zde bylo srovnáváno s médii B5 a BM.

Bazální média MS, MSB a B5 testovali u hrachu setého (*Pisum sativum*) Espósito a kol. (2012), kteří dosáhli srovnatelných výsledků jak na médiu MS, tak na médiu MSB. U média MS však bylo zapotřebí použít vyšších koncentrací fytohormonů, aby byl efekt srovnatelný s médiem MSB.

Obecně se při přímé organogenezi hrachu (*Pisum* sp.) a hrachoru (*Lathyrus* sp.) používá nejčastěji bazálního média MS (Saglam 2012; Sharma a kol. 2004; Tzitzikas a kol. 2004; Zhahui a kol. 2009) a MSB (Franklin a kol. 2000; Khan a kol. 2010; Ochatt a kol. 2013; Smýkal a kol. 2007).

Tab. 5: Tvorba kalusu u hrachu setého (*Pisum sativum*) cv. Lincoln dle Sharma a kol. (2000)

explantát	médium	rostliny tvořící kalus (%)
list	SH*	20
epikotyl		60
kořen		40
list	LS**	53,3
epikotyl		66,6
kořen		46,6
list	MS	100
epikotyl		93,3
kořen		80
list	B5	86,6
epikotyl		93,3
kořen		73,3
list	W***	66,6
epikotyl		73,3
kořen		46,6

Všechna média byla doplněna o BAP 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l

*Schenk a Hildebrandt 1972

**Linsmaier a Skoog 1965

***White 1963

Nejčastěji používanou látkou pro zpevnění kultivačního média u bobovitých (*Fabaceae*) je agar (Aslam a kol. 2006; Khan a kol. 2010; Sahin-Demirbag a kol. 2008; Supe a Roymon 2011). Saglam (2012) použil ke zpevnění média určeného pro kultivaci explantátů genotypu *Lathyrus ochrus* isubgol. Optimální koncentraci isubgolu, při které byly pro explantát nejdostupnější fytohormony a živiny v médiu obsažené, stanovil na 8 g/l. Při této koncentraci isubgolu dosáhl na médiu MS s přidanými fytohormony BAP 0,3 mg/l a NAA 0,2 mg/l průměrného zmnožení explantátů 5,9.

Při regeneraci přímou organogenezí rodů hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.) je nejčastěji používaným fytohormonem BAP (Espósito a kol. 2012; Franklin a kol. 2004; Saglam 2012). Barik a kol. (2004) srovnával působení BAP, KN a TDZ o různých koncentracích na explantáty hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) (Tab. 6), přičemž nejvyššího zmnožení dosáhl právě při použití BAP v koncentraci 2 mg/l. Na médiu doplněném o KN bylo dosaženo nižšího zmnožení a prýty byly kratší a regenerovalo o 20 % explantátů méně. Při

koncentraci TDZ 1 mg/l a vyšší docházelo místo regenerace výhonků k tvorbě kalusu.

Z Tab. 6 je také zřejmé, že vliv fytohormonů je závislý na genotypu. To potvrzují i jiné studie. Například Ochatt a kol. (2001) dosáhli u stejného druhu, ale jiných genotypů nejlepších výsledků při koncentracích BAP 3 mg/l a 5 mg/l. Stejně tak Espósito a kol. (2012) dosáhl u různých genotypů hrachu setého (*Pisum sativum*) nejlepších výsledků při koncentracích BAP 5 mg/l a dokonce 11 mg/l. S TDZ nedosáhli dobrých výsledků ani Ochatt a kol. (2001) u hrachoru setého (*Lathyrus sativus*). V kontrastu s tím se podařilo Zhihui a kol. (2009) vypěstovat u semen hrachu setého (*Pisum sativum*) cv. Espace 16 prýtů/embrio při koncentraci TDZ 4 mg/l a i při 8 mg/l bylo zmnožení 14 prýtů/embrio. Ochatt a kol. (2001) zkoušeli použít také zeatin (ZEA), ale nedocházelo k žádné regeneraci.

Tab. 6: Srovnání vlivu genotypu a fytohormonů na explantáty hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) dle Barik a kol. 2004

genotyp	fytohormony	regenerace (%)	Ø prýtů/explantát	Ø délka prýtů (cm)
<i>Lathyrus sativus</i> IC-120451	BAP 2 mg/l	70	6,3	3,1
<i>Lathyrus sativus</i> IC-120453		80	7,4	3,6
<i>Lathyrus sativus</i> IC-120478		86,6	8,7	4,1
<i>Lathyrus sativus</i> IC-120487		93,3	11,3	4,9
<i>Lathyrus sativus</i> Nayagarh		88,3	10,6	3,8
<i>Lathyrus sativus</i> IC-120487	BAP 3 mg/l	83,3	10,4	4,4
	KN 2 mg/l	58,3	8,3	3,6
	KN 3 mg/l	63,3	8,7	4,1
	TDZ 0,05 mg/l	48,6	8,8	1,2
	TDZ 0,1 mg/l	51,1	9,2	0,9

BAP se často kombinuje s NAA o nízkých koncentracích (0,1-0,5 mg/l). Saglam (2012) a Barik a kol. (2005) uvádí při použití této kombinace u hrachoru (*Lathyrus* sp.) zvýšení regenerace explantátů. Ochatt a kol. (2013) zkoušeli kombinaci BAP a NAA u dvou rozdílných genotypů hrachoru setého (*Lathyrus sativus*), přičemž u jednoho genotypu vedla přítomnost NAA ke zvýšení zmnožení a u druhého naopak ke snížení. U hrachu setého (*Pisum sativum*) nemají nízké koncentrace NAA nebo KN přidaných do média spolu s BAP podle Supe a Roymon (2011) žádný vliv na regeneraci nových výhonků.

Podle Tzitzikas a kol. (2004) je možné dosáhnou většího zmnožení přidáním GA₃ k BAP, ale výhonky jsou tenčí a s delšími internodii.

3.3 Izolace protoplastů u bobovitých (*Fabaceae*)

Protoplasty jsou rostlinné, bakteriální nebo houbové buňky zbavené buněčné stěny, ohraničené pouze cytoplazmatickou membránou. Protoplasty rostlin mají schopnost dediferenciace a totipotence. Kultivací v *in vitro* podmínkách dochází k obnově jejich buněčné stěny. Za vhodných podmínek vstupují znovu do buněčného cyklu, proliferují a tvoří kalus. Z kalusu je pak možné další kultivací regenerovat jednotlivé rostlinné orgány nebo celé rostliny. K jejich regeneraci dochází přes somatickou embryogenezi a organogenezi (Wiszniewska a Pindel 2010; Ochat a kol. 2000).

Získání protoplastů je cenné pro studium fungování rostlin na buněčné úrovni, studium buněčné ultrastruktury, cytoskeletu, fyziologie organel, vlastností plazmatické membrány, komunikace mezi buňkami nebo biosyntézy makromolekul (Sinha a kol. 2003a). Fůze protoplastů nám umožňuje překonávat bariéry sexuální inkompatibility při šlechtění nových odrůd kulturních rostlin (Wiszniewska a Pindel 2010).

Jako zdroj protoplastů slouží různé druhy pletiv, nejčastěji listový mezofyl, kalusové buňky a suspenzní kultury (Hradilík 2005).

Pro získání protoplastů je možné využít mechanické izolace v hyperosmotickém médiu. Mnohem vhodněji jsou ale rostlinná pletiva vkládána do enzymatického roztoku celulólytických a pektinolytických enzymů. Pektinolytické enzymy způsobují rozpad pletiv na jednotlivé buňky štěpením střední lamely a celulólytické enzymy narušují vlastní buněčnou stěnu. Tím dochází k uvolnění protoplastu do enzymatického roztoku. Na činnost enzymů má vliv také pH enzymatického roztoku. To se obvykle pohybuje mezi 5,4-5,7 (Hradilík 2005). Složení a koncentrace enzymatického roztoku jsou stanovovány empiricky - jsou závislé na genotypu a občas i na použitém rostlinném orgánu (Wiszniewska a Pindel 2010).

U bobovitých (*Fabaceae*) je nejčastěji používanou celulázou "Onozuka" R-10, která se získává z houby kropidlák černý (*Aspergillus niger*). Tento enzym se ukázal být efektivním při izolaci protoplastů například u hrachu (*Pisum* sp.) (Durieu a Ochatt 2000; Xiao a Koster 2001), hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) (Durieu a Ochatt 2000), lupiny bílé (*Lupinus albus*) (Sinha a kol. 2003b), nebo sóje luštiné (*Glycine max*) (Dhir a kol. 1991).

Pektolyázy a hemicelulázy od sebe oddělují jednotlivé buňky z pletiva. Nejčastěji se u bobovitých (*Fabaceae*) používají pektolyáza Y-23, macerozym R-10 nebo jejich kombinace (Durieu a Ochatt 2000; Bhadra a kol. 1994; Sinha a kol. 2003b; Yan-Xiu a kol. 1995).

Izolační proces je pro rostlinné buňky velmi stresující, což negativně ovlivňuje

životnost protoplastů. Nepřítomnost buněčné stěny snižuje odolnost rostlinných buněk především proti negativnímu působení osmotického tlaku. Je proto potřeba zajistit vhodné izotonické prostředí během inkubace v enzymatickém roztoku a často se tkáň ještě vkládají do preplazmolytického roztoku před samotnou inkubací v enzymatickém roztoku. K vytvoření izotonického prostředí, díky kterému nedochází k prasknutí plazmatické membrány, se jako osmotika používají cukry sacharóza, glukóza, sorbitol nebo mannitol, případně anorganické soli (Hradilík 2005). Nejčastějším používaným preplazmolytickým roztokem u bobovitých (*Fabaceae*) je CPW (Frearson a kol. 1973) doplněné o různé množství mannitolu (nejčastěji 13 %). Obvykle se pak CPW doplněné o mannitol používá i jako základ pro enzymatický roztok a jako roztok promývací při samotné izolaci (Bhadra a kol. 1994; Sinha a kol. 2003b; Yan-Xiu a kol. 1995).

Po inkubaci rostlinného materiálu v enzymatickém roztoku je potřeba provést purifikaci a izolaci protoplastů. Nejprve se celý roztok přefiltruje přes ocelové sítko, nebo nylonovou tkaninu (uhelon), s velikostí pórů většinou okolo 70 μm . Tím se odstraní hrubé rostlinné zbytky od protoplastů (Hradilík 2005). Tento filtrát se pak centrifuguje ve sterilních centrifugačních zkumavkách. Intenzita centrifugace bývá velmi rozdílná. Protoplasty hrachu setého (*Pisum sativum*) byly centrifugovány při 250 g po dobu 10 min (Xiao a Kloster 2001). Durieu a Ochatt (2000) centrifugovali hrách setý (*Pisum sativum*) a hrachor setý (*Lathyrus sativus*) při 70 g po dobu 5 min. U *Vigna sublobata* byly protoplasty centrifugovány při 70 g po dobu 7 min (Bhadra a kol. 1994). U protoplastů *Sesbania bispinosa* použili Yan-Xiu a kol. (1995) centrifugaci při 100 g po dobu 5 min.

Po této centrifugaci protoplasty vytvářejí sediment na dně zkumavky. Pomocí pipety se odstraní supernatant a je nahrazen 21% roztokem sacharózy a zkumavka s obsahem se opět centrifugují. Intenzita centrifugace nabývá opět různých hodnot. U bobovitých (*Fabaceae*) byly protoplasty centrifugovány při 80 g po 10 min (Durieu a Ochatt 2000), 80 g po 3 min (Yan-Xiu a kol. 1995) nebo při 60 g po 7 min (Bhadra a kol. 1994).

Po centrifugaci s roztokem sacharózy se na povrchu supernatantu vytváří prstenec protoplastů, který se pomocí pipety odebere.

Izolované protoplasty je potřeba kultivovat na vhodném médiu. U bobovitých (*Fabaceae*) se nejčastěji používají rozličně modifikovaná K8P (Kao 1977) a KM8P (Kao a Michayluk 1975). Durieu a Ochatt (2000) použili pro kultivaci protoplastů hrachu (*Pisum* sp.) a hrachoru (*Lathyrus* sp.) médium doplněné o fytohormony NAA, ZEA a 2,4-D.

Pokud jsou podmínky, které médium protoplastům poskytuje, optimální, je buněčná stěna regenerována během 12 h až několika dní. Tvorbou buněčné stěny ztrácí protoplasty

svůj sférický tvar a může u nich docházet k cytokinezi, pro kterou je buněčná stěna nezbytná. V momentě, kdy se buňky dělí a začínají vytvářet kolonie o velikosti přibližně 1mm, je nezbytné pasážovat je na médium bez osmotika (Hradilík 2005).

Úspěšná izolace protoplastů, vznik celé nové rostliny cestou izolace protoplastů, následné regenerace buněčné stěny a tvorby kalusu, ze kterého je rostlina regenerována, je u bobovitých (*Fabaceae*) doložena (Wiszniewska a Pindel 2010; Ochatt a kol. 2000). Protoplastovým kulturám se u rodu hrách (*Pisum* sp.) věnovali Ochatt a kol. (2000); Durieu a Ochatt (2000) a Xiao a Koster (2001). U rodu hrachor (*Lathyrus* sp.) to byli Ochatt a kol. (2001; 2013). U *Vigna sublobata* získali protoplastovou kulturu Bhadra a kol. (1994). Protoplastovým kulturám sóji luštiné (*Glycine max*) se věnovali Dhir a kol. (1991). Nutriční požadavky protoplastů *Vicia hajastana* stanovily Kao a Michayluk (1975). Optimalizaci postupů pro získání a kultivaci protoplastových kultur u *Lupinus albus* se věnovali Sinha a kol. (2003a; 2003b). Izolaci a regeneraci protoplastů *Ceratonia siliqua* studovali Sotiriou a kol. (2007). Postup izolace protoplastů a jejich regeneraci u *Sesbania bispinosa* stanovily Yan-Xiu a kol. (1995).

Protoplastové kultury se úspěšně podařilo založit i u řady dalších rostlin, jako jsou petunie (*Petunia* sp.), mrkev (*Daucus* sp.), tabák (*Nicotiana* sp.), rajče (*Solanum* sp.), brambor (*Solanum* sp.), okurka (*Cucumis* sp.), náprstník (*Digitalis* sp.) nebo pomerančovník (*Citrus* sp.) (Hradilík 2005).

3.4 Zařazení čeledi *Fabaceae* do systému vyšších rostlin (dle Cronquist 1988)

- říše:	Plantae - rostliny
- podříše:	Cormobionta - vyšší rostliny
- oddělení:	Magnoliophyta - krytosemenné rostliny
- třída:	Magnoliopsida - dvouděložné rostliny
- podtřída:	Rosidae
- řád:	Fabales - bobotvaré
- čeleď:	Fabaceae - bobovité

3.4.1 Charakteristika čeledi *Fabaceae* (bobovité)

Čeleď bobovité se též někdy podle tvaru květu nazývá motýlokvěté (*Papilionaceae*),

nebo vikvovité (*Viciaceae*) podle rodu vikev. Zástupci jsou většinou byliny, zřídka i dřeviny a nikdy nerostou přímo ve vodním prostředí (Heywood a kol. 2007). Kořeny jsou často s hlízkami, pomocí kterých probíhá symbióza s nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*, u většiny zástupců zároveň probíhá také endomykorhiza. Listy jsou zpravidla složené, střídavé a nejčastěji sudo- nebo lichozpeřené. Dlanitě zpeřené jsou jen vzácně. Zástupci mají obvykle palisty, úponky nebo trny. Květenství jsou hroznovitá, jednotlivě bývají květy zřídka. Vzhled květu je pro čeled' velmi charakteristický. Zpravidla je v něm pět srostlých kališních lístků s pěti volnými nehetnatými okvětními lístky, mezi kterými rozlišujeme pavézu, dvě křídla a člunek tvořený dvěma okvětními lístky. Největší z nich bývá téměř vždy pavéza, pak křídla a nejmenší jsou lístky člunku. Ve vyjimečných případech mohou křídla nebo člunek chybět. Tyčinek je v květu deset a jsou uspořádány do kruhu. Jejich nitky jsou buď všechny srostlé (jednobratré), nebo je srostlých jen devět a desátá je volná. Gyneceum je apokarpní a semenník svrchní. Plodem je lusk, který může pukát jedním nebo dvěma švy. Semena nemají endosperm, nebo je vyvinuté jen nezřetelně. Embryo semene je vybaveno velkými dělohami, které jsou bohaté na bílkoviny a škrob. Semena mohou klíčit buď hypogeicky nebo epigeicky (Slavík 1995).

Čeled' *Fabaceae* je třetí největší ve světovém měřítku. Zahrnuje přibližně 480-500 rodů, které mají celkem okolo 12 000 zástupců. Zástupci *Fabaceae* jsou rozšířeni téměř po celém světě. Původnější dřevinné typy se vyskytují především v teplých geografických pásech, narozdíl od vývojově odvozenějších zástupců čeledi (Slavík 1995).

3.4.2 Charakteristika rodu *Pisum* - hrách

Hrachy (*Pisum* sp.) jsou jednoleté byliny s přímým stonkem, kterým je lodyha. Mají dlouhé vřetenovité kořeny. Jejich listy jsou sudozpeřené a zakončené úponkou. Lístků jsou 1-3 páry, jsou celokrajné nebo zubaté a oválného nebo srdčitého tvaru. V mládí jsou složené podél střední žilky. Palisty jsou bylinné, větší než jednotlivé lístky složených listů. Dlouze stopkaté květenství vyrůstá z úžlabí listů a je tvořeno chudokvětými hrozny nebo jednotlivými květy. Jejich kalich má zvonkovitý tvar, korunní lístky mohou být namodralé, narůžovělé, bílé nebo i 2-3barevné. Pavéza a křídla květu jsou typická velkou čepelí. Tyčinky v květu jsou dvoubratré. Děvět jich je nitkami srostlých přibližně do stejné výšky, jedna horní je buď přirostlá v polovině, nebo volná. Pestík má dorzálně zploštělou čnělku, která je na vrcholu rozšířená, rýhovaná z vnější strany a na vnitřní straně je ochlupená pod vrcholem. Plodem hrachů (*Pisum* sp.) je lusk, který se otevírá oběma švy. Je podlouhlý, nezaškrcovaný, s mnoha semeny a na vrcholu se zužuje v zobánek. Semena v něm mohou být

od kulovitých až po zaobleně mnohohranná s podlouhlým pupkem (Slavík 1995).

Rod je podle nejčastěji používané klasifikace členěn na 3 druhy - *Pisum sativum* (Subsp. *sativum* a *elatius*), *Pisum fulvum* a *Pisum abyssinicum* (Maxted a Ambrose 2000 dle Smýkal a kol. 2011), které jsou rozšířené v J Evropě, JV Asii a Africe (Slavík 1995).

3.4.3 Charakteristika rodu *Lathyrus* - hrachor

Rod hrachor (*Lathyrus* sp.) zahrnuje jednoleté, dvouleté a vytrvalé byliny. U jednoletých druhů jsou kořeny dlouze křivoité s krátkými postraními kořinky. Jinak jsou kořeny tohoto rodu větvené, dlouhé a silné. Loda je lysá, často větvená, vystoupavá až přímá, plazivá nebo popínavá. Může dosáhnout až 4 m délky a může být čtyřhranná. Listy na ní vyrůstají střídavě. Jsou sudozpeřené s 1-5 páry lístků s celistvými čepelemi. Vřetenolistu je zakončeno úponkem nebo hrotem. Listy bývají někdy přeměněny na fylodia nebo úponky. Palisty jsou obvykle dlouhé a úzké. Květy jsou oboupohlavné, stopkaté a rostou samostatně, nebo v hroznu. Vyrůstají z úžlabí listenu, který záhy opadá. Barva květů bývá bílá nebo je v různých odstínech červené, fialové, růžové, žluté a modré nebo je tvořena jejich kombinací. Souměrný kalich je tvořen pěti lysými, vytrvalými lístky. Opadávkoruna je jako u ostatních bobovitých (*Fabaceae*) tvořena pěti lístky členěnými na pavézu, člunek a křídla. V květu je deset tyčinek s devíti nitkami srostlými a jednou horní volnou. Nitky jsou strostlé přibližně do stejné délky. Pestík má semeník s mnoha vajíčky. Jeho čnělka má nahoře dvě řady chlupů, nebo je chlupatá celá. Pod vrcholem je ze hřbetu zploštělá a často rozšířená. Blizna je kulovitá. Plody hrachoru (*Lathyrus* sp.) jsou lusky, které nemají přepážky, otevírají se oběma švy nebo se výjimečně neotevírají a jsou neopadavé. Na vrcholu jsou zúžené v zobánek a jejich báze je bez gynopodia. Semena nebývají zploštělá, nebo jsou zploštělá jen mírně, s povrchem hladkým nebo bradavičnatým a většinou nezřetelnou radikulou. Semena některých druhů mohou být jedovatá (Slavík 1995).

Rod hrachor (*Lathyrus* sp.) je tvořen přibližně 150 druhy s těžištěm výskytu v Evropě, Asii a S Americe. Méně se vyskytuje v mírném pásu J Ameriky a v tropech V Afriky (Slavík 1995).

3.4.4 Charakteristika vybraných druhů čeledi *Fabaceae*

3.4.4.1 *Lathyrus neurolobus*

Lathyrus neurolobus (Obr. 1) je vytrvalá bylina a hemykryptofyt (Bergmeier a Abrahamczyk 2007) s tenkými oddenky. Je celý lysý s výjimkou vnitřního povrchu kalichu a báze lístků. Stonky jsou bohatě větvené, až 50 cm dlouhé, přibližně 1 mm silné s drobnými

lištami po celé délce a čersvě zelenou barvou. Listy jsou po dvou, téměř přisedlé s řápkem do 5 mm, úzce eliptické až podlouhlé, s třemi paralelními žilkami. Úponky jsou jednoduché, nebo málo větvené. Palisty jsou pološípovité. Kvete v květnu a červnu. Květenství je tvořené párem květů nebo samostatnými květy, vyrůstajícími v horní části

Obr. 1: *Lathyrus neurolobus*



http://www.mittelmeerflora.de/Zweikeim/Fabaceae/lath_blau_klein.htm

listových úžlabí. Květy mají 2-4 mm dlouhou stopku, která se při přeměně na plod prodlužuje na cca 6 mm. Květy jsou 6-9 mm velké, se zvonkovitým kalichem, který je světle zelený s nádechem do fialové. Koruna je fialová s tmavšími žilkami. Tyčinek je 10, z toho 9 srostlých a 1 volná. Čnělka je dlouhá 3 mm, mírně kopišťovitá, s chomáčkem chloupků ve vrchní části. Luský nesou 4-8 semen, která mají barvu od tmavě hnědé až po černou a vystupující žilku v oblasti pupku (Kenicer a Norton 2008).

Lathyrus neurolobus je endemitickou rostlinou západní Kréty (Fielding a Turland 2005), kde se vyskytuje v mokřadních společenstvech v nadmořských výškách od 160 do 800 m. n. m., s hlavním těžištěm mezi 500-700 m. n. m. Plocha jeho výskytu je pouhých 30 km² na západním a severozápadním úbočí pohoří Lefka Ori. Přestože je pohoří převážně vápencového charakteru, vyskytuje se zde *Lathyrus neurolobus* pouze na křemičitých fylitech a kvarcitech, tedy značně kyselých horninách (Bergmeier a Abrahamczyk 2007).

3.4.4.2 *Lathyrus clymenum* - hrachor popínavý

Rostlina je jednoletá a celá lysá. Dorůstá do velikosti 30-100 cm. Její lodyha je křídlatá, poléhavá a větvená (Obr. 2). Listy hrachoru popínavého (*Lathyrus clymenum*) jsou střídavé s hrálovitými palisty. Dolní listy rostliny jsou bezčepelné, tvořené jen křídlatým větvenem. Listy střední a horní části rostliny jsou sudozpeřené s úponky. Lístky rostou ve 2-4 jařmech nebo nepárově. Jsou celokrajné, úzce kopinaté až čárkovité, 2-6 cm dlouhé. Květy rostou samostatně, nebo po 2-5 v květenství. Jsou stopkaté, 15-20 mm dlouhé. Jejich pavéza je na bázi vypuklá, světle fialová až karmínová. Křídla jsou světlejší, růžové až lila. Luský má zploštělé, lysé, hnědé barvy a se 4-7 semeny. Kvete v březnu až červnu (Zelený 2012).

Hrachor popínavý (*Lathyrus clymenum*) roste do nadmořské výšky 700 m. n. m.

(Lafranchis 2009). Je rozšířený téměř po celém mediteránu J Evropy a S Afriky a ve V Evropě. Separovaná populace se nachází také na Kanárských ostrovech. Jeho nejobvyklejšími stanovišti jsou obdělávané plochy, úhory a okraje cest, často ve skalnatém nebo písčitém terénu (Zelený 2012).

Obr. 2: *Lathyrus clymenum*



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/af/Lathyrus_clymenum2.JPG

3.4.4.3 *Lathyrus ochrus* - hrachor žlutoplodý

Hrachor žlutoplodý (*Lathyrus ochrus*) je jednoletá bylina (Obr. 3). Jejím stonkem je poléhavá či popínavá lodyha, dosahující délky mezi 20 a 60 cm. Je křídlatá a lysá, jen křídla mohou být někdy drsně chlupatá. Listy rostoucí v dolní a střední části lodyhy jsou redukovány v podlouhle kopinatá fylodia. Listy na horní části stonku jsou tvořeny 1-2 páry lístků, které jsou zakončeny větvenými úponky. Horní listy mají podlouhle vejčité větveno s vejčitými lístky, které jsou 15-35 mm dlouhé a 6-20 mm široké. Povrch lístků je lysý a barva sivě zelená. Palisty se vyskytují jen u horních listů a jsou kopinatě vejčité až polostřelovité. Květy hrachoru žlutoplodého (*Lathyrus ochrus*) rostou po jednom nebo v páru a jsou nící. Jejich kalich je široce zvonkovitý s nafouklou trubkou a kališními cípy přibližně stejně dlouhými jako je kališní trubka. Korunní lístky jsou světle žluté. Pavéza je tupá a obvejčitého tvaru. Křídla jsou stejně dlouhá jako pavéza, ovšem člunek je kratší a tupý. Kvete v květnu až červnu. Plody jsou lusky obsahující 4-7 semen. Lusky jsou 30-60 mm dlouhé a 8-12 mm

široké. Jsou zploštělé, lysé a na břišním švu mají 2 křídla. Barvu mají světle hnědou. Semena jsou jen slabě zploštělá, velká 6-7 mm. Jejich povrch je hladký, světle hnědý až červenohnědý. Jejich hilum zabírá přibližně 1/6 obvodu (Slavík 1995).

Hrachor žlutoplodý (*Lathyrus ochrus*) je původem ze Středozeší a JZ Asie (Slavík 1995).

Obr. 3: *Lathyrus ochrus*



<http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-052/lathyrus-ochrus1076.jpg>

3.4.4.4 *Pisum fulvum*

Rostlina je jednoletá bylina s hlavním kořenem. Dutý stonek je až 2 m dlouhý, pnoucí se pomocí úponků (Obr. 4). Je lysí, nebo jen řídce ochlupený. Řapíkaté listy s nápadnými palisty rostou střídavě. Jsou zpeřené, mají pilovitou až zubatou čepel a 2-4 lístky. Palisty jsou srdčité až šípovité, se zubatou čepelí. Listeny jsou velmi malé, nebo chybí. Květy jsou zygomorfní oboupohlavné a mají oranžovou až žlutou barvu. Rostou v hroznech po 2-6, které vyrůstají z úžlabí listů. Mají tyčinky s ochlupenou nitkou, 9 srostlých a 1 volnou. Doba kvetení je od března do května. Plodem je podlouhlý plochý lusk, nesoucí 3-10 téměř kulovitých semen. Semena jsou hladká a mají olivově hnědou až černou barvu (Bogler 2010). *Pisum fulvum* roste ve V Středozeší (Bogler 2010).

Obr. 4: *Pisum fulvum*



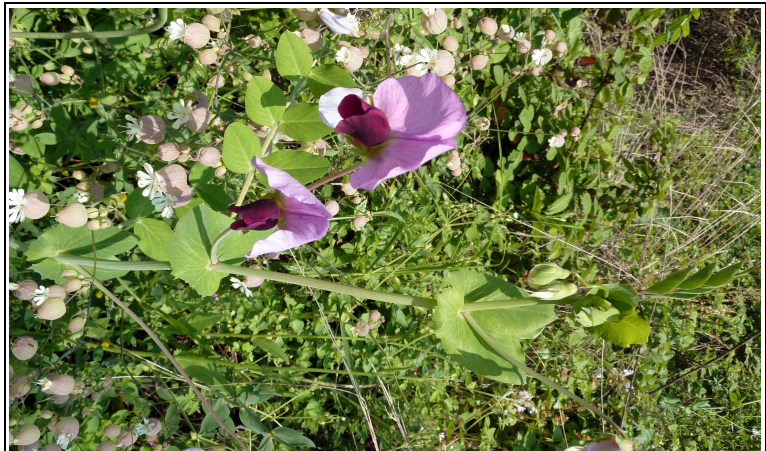
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/Pisum_fulvum.JPG

3.4.4.5 *Pisum sativum* subsp. *elatius* (syn. *Pisum elatius*) - hrách setý

Jde o jednoletou lysou bylinu, která má často liánovitě pnoucí stonek, až 2 m dlouhý. Její listy končící větveným úponkem jsou sudozpeřené a střídavé, se sivými, celokrajnými nebo zubatými listy. Má výrazné palisty 1,5-8 cm dlouhé. Květy vyrůstají v hroznovitých květenstvích na dlouhé stopce po 1-3 květech. Kalich je trubkovitý, 8-15 mm dlouhý. Jeho cípy nejsou stejně dlouhé. Koruna je nápadně dvoubarevná. Pavéza je růzovofialová a křídla jsou tmavší, červenofialová, 16-30 mm dlouhá. Plody jsou podlouhlé až čárkovité lusky 6-10 cm dlouhé, se 3-10 semeny. Semena jsou kulovitá a přibližně 5 mm velká (Grulich 2011).

Obr. 5: *Pisum elatius*

Roste ve Středozeří, JV a V Evropě. Osídluje stepní trávníky, okraje polí, ale i křovinatá místa a lesní lemy. Preferuje mělké, kamenité půdy a vystupuje až do nadmořské výšky 1700 m. n. m. (Grulich 2011).



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Pisum_sativum_elatius_1.jpg

4 Materiál a metody

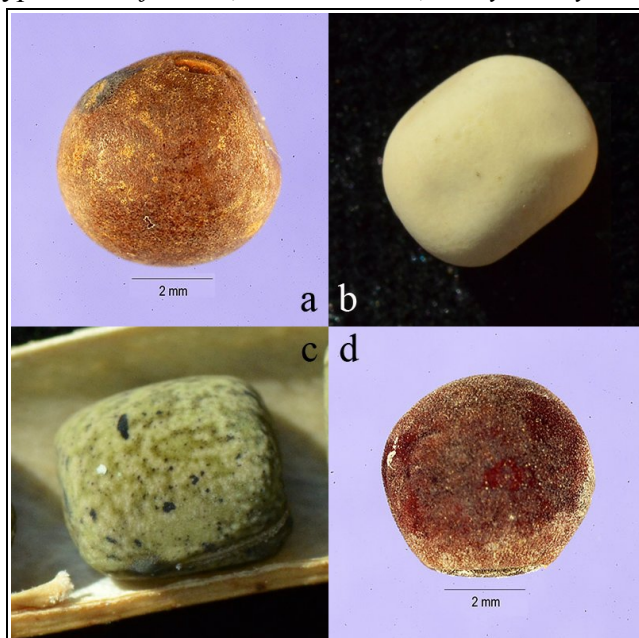
4.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál pro zakládání aseptických kultur byla použita semena šesti různých genotypů. Semenný materiál pro potřeby této práce poskytl Ing. Petr Smýkal, Ph.D. Semena byla získána z kolekcí genových bank (ATFC, RBGE, ICARDA, JIC, Nordic Gene Bank). Jednotlivé genotypy a jejich původ jsou uvedeny v *Tab. 7*.

Tab. 7: Přehled použitých genotypů a jejich původu

druh	identifikační číslo genotypu	původ	genová banka
<i>Pisum fulvum</i>	WL 2140	Izrael	Nordic Gene Bank (SWE)
<i>Pisum elatius</i>	J1 1794	Izrael	JIC (UK)
<i>Lathyrus ochrus</i>	ATC 81371	Alžírsko	ATFC (AUS)
<i>Lathyrus clymenum</i>	ATC 81087	Řecko	ATFC (AUS)
	NS-01	Sýrie	ICARDA (SYR)
<i>Lathyrus neurolobus</i>	20080542	Kréta	RBGE (UK)

Obr. 6: Semena genotypů *Pisum fulvum*, *Pisum elatius*, *Lathyrus clymenum* a *Lathyrus ochrus*



- a) *Pisum fulvum* (http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=pifu_001_ahp.tif)
b) *Lathyrus ochrus* (<http://web3.wzw.tum.de/oscar/wiki/images/9/9f/L.ochusseed.jpg>)
c) *Lathyrus clymenum* (<http://web3.wzw.tum.de/oscar/wiki/images/9/90/L.clymenumpod.jpg>)
d) *Pisum elatius* (http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=piel5_001_ahp.tif)

4.2 Chemikálie a roztoky

- 0,1M HCl
- 0,1M KOH
- 2,5% a 5% Chloramin B (BOCHEMIE s.r.o., Česká republika)
- 21% roztok sacharózy
- 36% SAVO (Unilever ČR s.r.o., Česká republika)
- 70% a 95% ethanol
- Alar 85 (Crompton Manufacturing Company, USA)
- antibiotika ampicilin, chloramphenicol a cefotaxim (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- celuláza Onozuka R-10 (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- enzymatické roztoky ENZ 1, ENZ 2, ENZ 3 (*složení viz. kap. 4.6.2*)
- fluorescein diacetát (FDA) (Serva, USA)
- fytohormony BAP, IBA, NAA, GA₃, 2,4-D (Sigma-Aldrich, Německo)
- glutamin (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, Německo)
- kultivační média A, B, C, D (*složení viz. kap. 4.5.1*)
- kultivační média AA, BA, CA, DA (*složení viz. kap. 4.5.1*)
- kultivační média B1, B2, B5, B10 (*složení viz. kap. 4.5.1*)
- kultivační média OK, OKA, OK100, a OKatb (*složení viz. kap. 4.5.1*)
- kultivační média Y a Z (*složení viz. kap. 4.6.6*)
- macerozym R-10 (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- mannitol (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- médium MS (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) (*složení viz. Příloha 1*)
- pektolyáza Y-23 (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Plant agar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- roztoky CPW a PGly (*složení viz. Přílohy 2 a 3*)
- roztok CPW13 (*složení viz. kap. 4.6.2*)
- sacharóza (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- sterilní destilovaná voda

4.3 Použité vybavení

- alobal, filtrační papír
- sterilní plastové Petriho misky, skleněné Petriho misky
- kahan
- skalpel a pinzeta
- parafilm
- kádinky, odměrné válce
- váženky, laboratorní lžičky a špachtle
- podložní a krycí sklíčka
- uzavíratelné láhve vhodné pro použití do autoklávu
- Erlenmeyerovi baňky 100 ml
- lednice
- třepačka KS 130 basic (IKA, Německo)
- sušárna Binder FD53 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- analytické váhy AE 240 (Mettler-Toledo, Česká republika)
- autokláv (Vitrum, Česká republika)
- elektromagnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph, Německo)
- mikrovlnná trouba
- flowbox AH-100 (Telstar, Španělsko)
- pipetník 10 ml, sterilní plastové pipety 2 ml a 5 ml, skleněné Pasteurovi pipety 2 ml
- mikropipeta (Eppendorf, Německo)
- termostat Binder BF115 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- digitální pH metr FE20-KIT (Mettler-Toledo, Česká republika)
- centrifuga ROTOFIX32 (Hettich, Německo)
- centrifugační zkumavky 10 ml
- Bürkerova komůrka
- uhelón o průměru pórů 72 μm
- fluorescenční mikroskop BX60 (Olympus Optica, Japonsko) s chlazenou CCD kamerou DP72 (Olympus Optica, Japonsko)
- světelný inverzní mikroskop CK40 (Olympus Optica, Japonsko)
- digitální váha KB (Kern, Německo)

4.4 Povrchová sterilizace a klíčení semen

Při povrchové sterilizaci semen byly jako sterilizační roztoky testovány 36% SAVO a chloramin B o 2,5% a 5% koncentraci. Všechna semena byla povrchově sterilizována v injekčních stříkačkách.

U *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC 81371, *Lathyrus clymenum* ATC 81087 a *Lathyrus clymenum* NS-01 probíhala povrchová sterilizace v následujících krocích:

- 1) nasát 70% ethanol do stříkačky a nechat působit 1 min
- 2) odstranit 70% ethanol a nasát sterilizační roztok
- 3) odstranit sterilizační roztok a 3x propláchnout sterilní destilovanou vodou
- 4) odstranit píst stříkačky ve flowboxu a umístit semena do sterilních petriho misek se sterilním filtračním papírem navlhčeným sterilní destilovanou vodou
- 5) kultivovat v termostatu při teplotě 27 °C

Během celého procesu bylo s injekčními stříkačkami občas lehce zahýbáno kvůli lepšímu omývání semen roztokem. Tento postup byl u *Pisum fulvum* WL 2140, *Lathyrus ochrus* ATC 81371, *Lathyrus clymenum* ATC 81087 testován ve čtyřech variantách podle druhu sterilizačního roztoku a doby jeho působení:

- 1) 5% Chloramin B po dobu 20 min
- 2) 36% SAVO po dobu 20 min
- 3) 36% SAVO po dobu 30 min (testováno jen u *Pisum fulvum*)
- 4) 36% SAVO po dobu 40 min

U *Pisum elatius* JI 1794 a *Lathyrus clymenum* NS-01 byla použita jen verze s 36% SAVEM působícím po dobu 40 min.

U *Lathyrus neurolobus* 20080542 byla kvůli malé velikosti semen tato před umístěním do injekční stříkačky nejdříve zabalena do uhelony, aby nedocházelo k jejich vypadávání a vyplachování ven ze stříkačky. Povrchová sterilizace probíhala v následujících krocích:

- 1) nasát 70% ethanol do stříkačky a nechat působit 1 min
- 2) odstranit 70% ethanol a nasát 36% SAVO (doba působení 10 nebo 15 min)
- 3) odstranit 36% SAVO a 3x propláchnout sterilní destilovanou vodou

- 4) odstranit píšť stříkačky ve flowboxu a vložit semena do sterilních petriho misek se sterilním filtračním papírem navlhčeným sterilní destilovanou vodou na dobu 24 h
- 5) umístit semena ve flowboxu do roztoku 2,5% chloraminu B na dobu 3 min
- 6) 3x propláchnout sterilní destilovanou vodou
- 7) vložit semena do sterilních petriho misek se sterilním filtračním papírem navlhčeným sterilní destilovanou vodou nebo do petriho misek s MS médiem
- 8) kultivovat v termostatu při teplotě 27 °C

4.4.1 Ožívání semen

Vzhledem k vysokému obsahu fenolických látek a nízké klíčivosti u semen *Lathyrus ochrus* ATC 81371 byly u tohoto druhu testovány dva postupy pro jejich oživení:

1. Semena byla nejprve ponechána po dobu 24 h v kádince s roztokem GA₃ o koncentraci 0,01 mg/l. Po té byla provedena sterilizace s pomocí 36% SAVA působícího po dobu 40 min.
2. Byla provedena sterilizace s pomocí 36% SAVA působícího po dobu 40 min. Po té byla semena ponechána v kádince se sterilní destilovanou vodou po dobu 24 h pro nabotnění a vyplavení fenolických látek. Následovala druhá povrchová sterilizace - 70% ethanol po dobu 1 min a 36% SAVO po dobu 5 min.

4.5 Mikropropagace

Po naklíčení semen byly ve sterilním prostředí flowboxu odstraněny obě dělohy a převážná část kořínku a výsledný explantát byl umístěn do kultivačního média.

4.5.1 Kultivační média

U všech použitých kultivačních médií bylo použito jako bazální médium MS a pH všech kultivačních médií bylo upraveno na $5,7 \pm 0,1$. Všechna média obsahovala 20 mg/l kyseliny askorbové a 20 g/l sacharózy a byla zpevněna pomocí agaru 7 g/l. Média byla rozlita po 30 ml do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml.

Nejprve byly explantáty získané ze semen namnoženy na médiu OK (Tab. 8). Poté byla testována média s obsahem rostlinného hormonu BAP (Tab. 8). Tato média byla testována u genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01. Jako kontrolní bylo použito médium OK.

U genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus ochrus* ATC81371 bylo sledováno zmnožení za podmínek, kdy po 4 týdnech kultivace na médiích B1, B2, a B5 byly celé explantáty bez nařezání pasážovány na médium OK a zde kultivovány další 4 týdny.

Dále byl testován vliv růstového retardantu Alar 85 v médiu OKA (Tab. 8) na explantátech genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus ochrus* ATC81371. Médium OKA bylo médium OK doplněné o Alar 85 v koncentraci 1,5 mg/l. Cílem experimentu bylo zkrácení internodií kultivovaných explantátů. Jako kontrolní médium bylo použito médium OK.

Za stejným účelem bylo testováno i médium OK100 (Tab. 8) u genotypu *Lathyrus clymenum* ATC81087. Jako kontrolní médium bylo použito médium OK.

Kvůli vnitřním bakteriálním kontaminacím byl před izolací protoplastů rostlinný materiál kultivován na médiu OKatb, což bylo médium OK doplněné o antibakteriální antibiotika ampicilin 400 mg/l a chloramphenicol 100 mg/l. Na tomto médiu byly kultivovány explantáty genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01.

Tab. 8: Koncentrace rostlinných hormonů v kultivačních médiích B1, B2, B5, B10, OK a OK100 (v mg/l)

fytohormony	médium					
	B1	B2	B5	B10	OK	OK100
BAP	1	2,5	5	10	0,01	1
IBA	-	-	-	-	0,01	1

4.5.2 Pasážování a kultivace

Při pasážování byly explantáty nařezány skalpelem na segmenty se dvěma nody a ty byly umístěny na čerstvé kultivační médium. První pasážování proběhlo po 5 týdnech, ale kvůli vyskytující se vitifikaci byla perioda pasážování zkrácena na 4 týdny. V tomto intervalu proběhla všechna následující pasážování. Kultivace explantátů probíhala v kultivační místnosti s denním režimem 16/8 h den/noc a teplotou 22±2°C.

4.5.3 Hodnocení mikropropagace

Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních. Bylo hodnoceno zmnožení (počet pasážovaných dvounodálních segmentů z jednoho explantátu), kořenění

(výskyt kořenů u explantátů), větvení (počet prýtů na explantát) a průměrná délka internodií. Dále byla hodnocena vitifikace a nekrotizace explantátů a tvorba kalusu. Fotodokumentace explantátů byla pořízena před jejich vyjmutím z Erlenmeyerových baněk.

4.6 Izolace, purifikace a kultivace protoplastů

4.6.1 Rostlinný materiál pro protoplastové kultury

Jako rostlinný materiál pro protoplastové kultury byly použity mladé listy a palisty z explantátů genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01. Listy a palisty byly odebírány z *in vitro* pěstovaných rostlinek 14 dnů po pasáži.

4.6.2 Enzymatické roztoky

Listy a palisty byly nařezány na proužky a poté vloženy do preplazmolytického roztoku v Petriho misce, který byl následně nahrazen enzymatickým roztokem (Tab. 9), jehož působením došlo k uvolnění mezofylových protoplastů. Jako plazmolytické a promývací roztoky byly použity PGly a CPW s 13% mannitolem (CPW13). Použité roztoky byly sterilizovány filtrací.

Tab. 9: Složení enzymatických roztoků (koncentrace enzymů v %)

enzymatický roztok	celulóza R-10	pektolyáza Y-23	macerozym R-10
ENZ 1	1	0,1	0,3
ENZ 2	1	0,1	0,9
ENZ 3	2	0,1	1,5

Kvůli výskytu vnitřních bakteriální kontaminací během mikropropagace explantátů, ze kterých byl odebírán rostlinný materiál pro izolaci protoplastů, byly provedeny také experimenty, při kterých byl sledován vliv antibiotika cefotaximu. Při těchto experimentech byly použity mladé listy z explantátů, které nebyly kultivovány na médiu OKatb. Místo antibiotik v kultivačním médiu při mikropropagaci (kap. 4.5.1), byl přidán cefotaxim přímo do enzymatického roztoku v koncentraci 150 mg/l.

4.6.3 Izolace a purifikace protoplastů

Po natrávení nařezaných mladých listů v enzymatických roztocích byly uvolněné

mezofylové protoplasty izolovány a purifikovány. Pro přefiltrování rostlinného materiálu, kterým se odstranily hrubé části natráveného pletiva, byl použit uhelón s velikostí pórů 72 μm . Jako purifikační roztok byl použit 21% roztok sacharózy rozpuštěné v destilované vodě. Uvedené roztoky byly sterilizovány filtrací. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

4.6.3.1 Pracovní postup při použití enzymatického roztoku ENZ 1

1. Nařezat mladé lístky o váze 200-500 mg a vložit do 5 ml PGly ve sterilní petriho misce na dobu 1-1,5 h
2. Odpipetovat preplazmolytický roztok a zalít rostlinný materiál enzymatickým roztokem ENZ 1 (5 ml)
3. Třepat 10 min na třepačce při rychlosti 80 kyvů/min
4. Uložit do termostatu na 18 h
5. Třepat 10 min na třepačce při rychlosti 80 kyvů/min
6. Přefiltrovat do čisté sterilní Petriho misky přes uhelón 72 μm
7. Přepipetovat filtrát do 10 ml sterilní zkumavky a doplnit do 10 ml PGly
8. Centrifugovat při 700 ot/min (70 g) po dobu 10 min
9. Odpipetovat supernatant
10. Resuspendovat sediment 4 ml 21% sacharózy a převrstvit 2 ml PGly
11. Centrifugovat při 700 ot/min (70 g) po dobu 10 min
12. Odpipetovat prstenec a resuspendovat jej v 4 ml Pgly a centrifugovat při 700 ot/min (70g) po dobu 10 min
13. Odpipetovat supernatant a resuspendovat 1,5 ml kultivačního média Y nebo Z (viz. *kap. 4.6.6*)

4.6.3.2 Pracovní postup při použití enzymatických roztoků ENZ 2 a ENZ 3

1. Nařezat mladé lístky o váze 200-500 mg a vložit do 5 ml CPW13 ve sterilní petriho misce na dobu 1-1,5 h
2. Odpipetovat preplazmolytický roztok a zalít rostlinný materiál enzymatickým roztokem ENZ 2/ENZ 3 (5 ml)
3. Třepat 10 min na třepačce při rychlosti 80 kyvů/min
4. Uložit do termostatu na 18 h

5. Třepat 10 min na třepačce při rychlosti 80 kyvů/min
6. Přefiltrovat do čisté sterilní Petriho misky přes uhelon 72 μm
7. Přepipetovat filtrát do 10 ml sterilní zkumavky a doplnit do 10 ml PGly
8. Centrifugovat při 700 ot/min (70 g) po dobu 10 min
9. Odpipetovat supernatant
10. Resuspendovat pomocí 0,25 ml CPW13
11. Resuspendovat sediment 7 ml 21% sacharózy
12. Centrifugovat při 800 ot/min (80 g) po dobu 10 min
13. Odpipetovat prstenec a resuspendovat jej do 1,5 ml kultivačního média Y nebo Z
(viz. kap. 4.6.6)

4.6.4 Vliv preplazmolýzy

Při izolaci protoplastů byl testován také vliv preplazmolýzy na hustotu a životnost získaných protoplastů. Byly provedeny pokusy, při kterých byly nařezané mladé listy vloženy přímo do enzymatického roztoku bez předchozí preplazmolýzy. Výsledky těchto experimentů pak byly srovnány s výsledky získanými při použití postupů, které preplazmolýzu zahrnují (kap. 4.6.3.1 a 4.6.3.2)

4.6.5 Stanovení hustoty a životnosti protoplastů

Hustota protoplastů byla stanovena v inverzním mikroskopu Olympus CK40 pomocí Bürkerovi komůrky. Na Bürkerovu komůrku byla nanесena kapka suspenze protoplastů a překryta krycím sklíčkem. Na každé ze dvou mřížek, které Bürkerova komůrka má, byl spočítán počet protoplastů v deseti náhodně vybraných čtvercích. Zjištěná hustota byla přepočítána na 1 g výchozí čerstvé hmoty použitého rostlinného materiálu. Pro výpočet hustoty protoplastů byl použit následující vzorec:

$$P = \frac{p \times v \times h \times z}{y}$$

P ... hustota protoplastů v 1 ml
p ... celkový počet buněk ve sledovaných čtvercích
v ... převrácená hodnota plochy jednoho políčka, ve kterém jsou protoplasty počítány
h ... převrácená hodnota hloubky komůrky
y ... počet počítaných čtverců
z ... zředění vzorku

Stanovení životnosti protoplastů bylo prováděno ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60 a byl k němu potřeba pracovní roztok FDA, který se připravuje naředěním 20 µl zásobního roztoku v 1 ml promývacího roztoku. Zásobní roztok FDA se připravuje rozpuštěním 5 mg FDA v 1 ml acetonu a uchovává se při -20 °C.

Na podložní sklíčko byla nanесena kapka suspenze protoplastů a do ní přidáno 20 µl pracovního roztoku FDA. Po 1 min byla suspenze překryta krycím sklíčkem. FDA je vstřebáván buňkami a v živých buňkách je enzymem esterázou hydrolyzován na fluorescein, který je možné sledovat ve fluorescenčním mikroskopu, kde svítí jasně zeleně. Životnost se stanovuje tak, že se nejprve v normálním procházejícím světle spočítají všechny protoplasty v daném zorném poli, a pak se ve stejném zorném poli spočítají zeleně fluoreskující živé buňky. Sčítání bylo prováděno vždy v deseti náhodně vybraných zorných polích vzorku. Životnost se vyjadřuje v procentech jako poměr živých (fluoreskujících) buněk k celkovému počtu živých i odumřelých buněk.

4.6.6 Kultivace protoplastů

Po zjištění hustoty protoplastů byla protoplastová suspenze naředěna kultivačním médiem na cílovou hustotu protoplastů $1,5 \times 10^5/\text{ml}$. Základ kultivačních médií pro protoplasty tvořilo tekuté MS médium doplněné o 90 g/l mannitolu a 30 g/l sacharózy. Dále kultivační média obsahovaly rostlinné hormony, tak jak jsou uvedeny v *Tab. 10*. Médium Y ještě obsahovalo glutamin v koncentraci 1 mg/l.

Petriho misky (o průměru 30 mm) s 1,5 ml protoplastové suspenze byly kultivovány ve tmě v termostatu při teplotě $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tab. 10: Složení rostlinných hormonů v kultivačních médiích pro protoplasty (v mg/l)

médium	BAP	NAA	2,4-D
Y	2	-	1
Z	1	0,2	-

5 Výsledky

Experimenty byly prováděny u genotypů *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus neurolobus* 20080542, *Pisum fulvum* WL 2140 a *Pisum elatius* JI 1794 v období od března 2013 do listopadu 2014 v laboratoři tkáňových kultur Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

5.1 Povrchová sterilizace semen

Při povrchové sterilizaci pomocí 36% SAVA se při všech testovaných časech působení sterilizačního roztoku neprojevovaly během klíčení všech použitých genotypů, žádné kontaminace. Při použití 5% chloraminu B se u genotypu *Pisum fulvum* WL 2140 projeví kontaminace až po pasáži na kultivační médium OK, a to ve 30 % případech.

Hlavní rozdíl při odlišných sterilizačních postupech byl v množství vyklíčených semen. U *Pisum fulvum* WL 2140 bylo nejvíce vyklíčených semen při použití 36% SAVA působícího 40 min – klíčilo 60 % semen a u 36% SAVA působícího 20 min nejnižší – klíčilo 40 % semen (Tab. 11).

Tab. 11: Vliv sterilizačního média a doby jeho působení na klíčení semen jednotlivých genotypů

genotyp	sterilizační roztok	doba působení (min)	klíčivost* (%)	doba klíčení (dny)
<i>Pisum fulvum</i> WL 2140	SAVO 36%	20	40	4-6
		30	50	
		40	60	
	chloramin B 5%	20	50	
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	SAVO 36%	20	40	7-11
		40	50	
	chloramin B 5%	20	0	
<i>Lathyrus clymenum</i> ATC81087	SAVO 36%	20	60	3-5
		40	90	
	chloramin B 5%	20	70	
<i>Lathyrus clymenum</i> NS-01	SAVO 36%	40	97	3-5
<i>Pisum elatius</i> JI 1794	SAVO 36%	40	40	4-6

* testováno minimálně 10 a maximálně 40 semen

Vzhledem k následujícím kontaminacím při pasáži na médium OK u semen sterilizovaných pomocí 5% chloraminu B byl však tento postup vyhodnocen jako méně vhodný. Následně bylo testováno působení 36% SAVA po dobu 30 minut za účelem zkrácení doby sterilizace. Se zkrácením doby působení však došlo i ke snížení klíčivosti semen na 50 %.

Semena genotypu *Pisum elatius* JI 1794 měla 40% klíčivost při povrchové sterilizaci 36% SAVEM působícím po dobu 40 min. Jejich klíčení trvalo 4-6 dní.

U *Lathyrus ochrus* ATC81371 se povrchová sterilizace semen pomocí chloraminu B ukázala jako nefunkční (neklíčila žádná semena) a nejlepší klíčivosti bylo dosaženo při použití 36% SAVA působícího 40 min. Při tomto postupu klíčilo 50 % semen. Protože u semen *Lathyrus ochrus* ATC81371 nepřesáhla klíčivost v žádném z experimentů 50%, klíček špatně prorážel osemení, uvolňovalo se velké množství fenolických látek a klíčení trvalo ve srovnání s *Pisum fulvum* WL 2140 dlouho (7-11 dní), byly u tohoto genotypu testovány dva postupy oživování semen. Jak oživování bobtnáním vodou, tak použití GA₃ ale neměli na klíčení vliv (Tab. 12). Do roztoku GA₃ semena uvolnila více fenolických látek, než do čisté vody.

Tab. 12: Oživení semen bobtnáním v H₂O a roztoku GA₃ (0,1 mg/ml)

genotyp	rostlinný materiál	oživovací médium	doba působení (h)	klíčivost* (%)
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	semena	H ₂ O	24	20
		GA ₃		20

* testováno vždy 10 semen

U genotypu *Lathyrus clymenum* ATC81087 při všech testech klíčilo více jak 50 %, nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 36% SAVA působícího 40 min (Tab. 11). Při tomto postupu klíčilo 90 % semen. U genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01 bylo při stejném postupu dosaženo klíčivosti 97 %. Semena obou genotypů *Lathyrus clymenum* klíčila během 3-5 dnů.

Semena *Lathyrus neurolobus* 20080542, umístěná po sterilizaci na filtrační papír navlhčený sterilní destilovanou vodou neklíčila, ale při jejich umístění na médium MS vyklíčilo 10 % semen. Klíčení trvalo 8 dní.

5.2 *In vitro* propagace

Ze semenáčků byly odebírány explantáty genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus neurolobus* 20080542. Ty byly nejprve umístěny do média OK (Tab. 8, kap. 4.5.1). První hodnocení bylo provedeno po 5 týdnech kultivace. Vzhledem k vyskytující se vytrifikaci pak byla doba pasáže a interval hodnocení zkráceny na 4 týdny, což vedlo ke snížení intenzity a četnosti výskytu vytrifikace u všech genotypů.

Na médiu OK byly testovány všechny zkoumané genotypy (*Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus neurolobus* 20080542). Vitifikace ani nekrózy se při 4 týdenním cyklu pasážování neprojevovaly. Délka internodií, větvení a kořenění byly srovnatelné (Tab. 13). Jediný získaný explantát *Lathyrus neurolobus* 20080542 se na médiu nevyvíjel. Při srovnání dvou genotypů *Lathyrus clymenum* dosahoval ve všech sledovaných parametrech lepších výsledků genotyp NS-01, vyjma délky internodií, která byla ve srovnání s explantáty genotypu ATC81087 delší.

Tab. 13: Srovnání kultivace explantátů na médiu OK po 4 týdnech kultivace

genotyp	zmnožení*	kořenění*	větvení*	délka internodií (cm)
<i>Pisum fulvum</i> WL 2140	2	0,2	1,4	1,4
<i>Pisum elatius</i> JI 1794	1,9	-	1,3	0,8
<i>Lathyrus clymenum</i> ATC81087	2,2	-	1,8	1,8
<i>Lathyrus clymenum</i> NS-01	2,4	0,1	1,9	1,9
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	2,1	0,1	1,7	1,6

* na jeden explantát

Explantáty *Pisum fulvum* WL 2140 přibližně po třetí pasáži začali kvést a tvořit plody (Obr. 7) na všech verzích média OK. V plodech se vytvářela nezralá semena, ale žádné se nepodařilo dovést do zralého stavu. Kvetoucí výhony neposkytovaly dostatek vhodného rostlinného materiálu a tento genotyp proto nebyl použit při izolaci protoplastů.

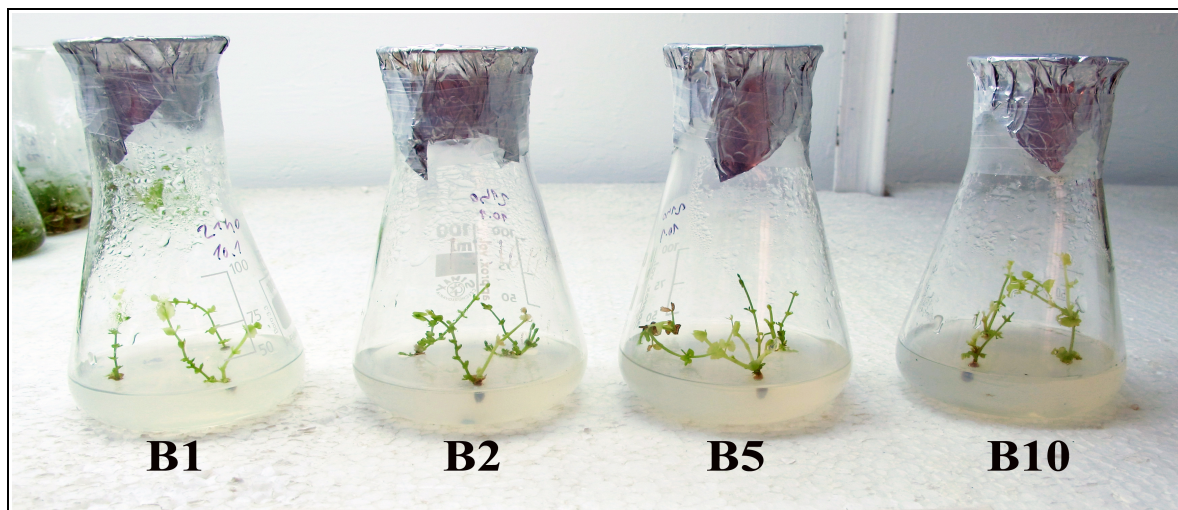
Obr. 7: Lusk explantátu *Pisum fulvum* WL 2140 kultivovaného na médiu OK



5.2.1 Vliv BAP na vývoj explantátů

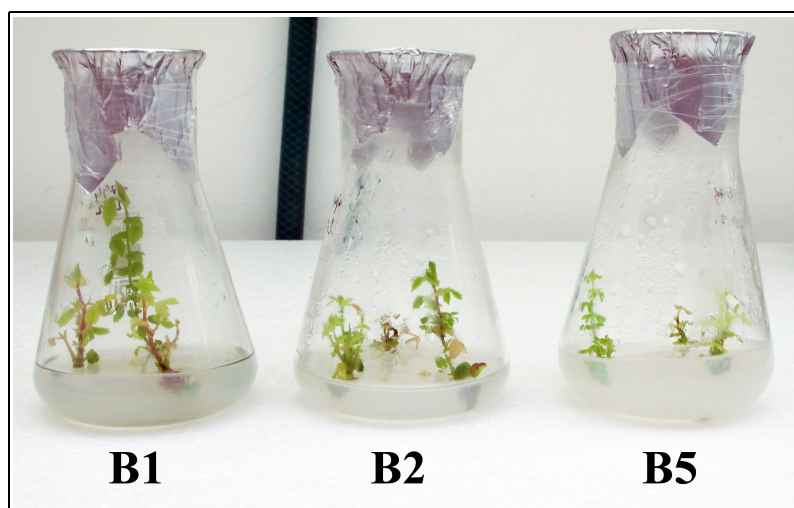
Vliv koncentrace BAP v kultivačních médiích byl u genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus ochrus* ATC8137 testován na médiích B1, B2, B5 a B10 (Tab. 8, kap. 4.5.1). Genotyp *Pisum fulvum* WL 2140 dosahoval největšího zmnožení (2,5) na médiu B2 (Tab. 14). Nejvyššího větvení dosahovaly explantáty na médiu B10 (2,7), ale výhony byly často příliš krátké pro pasážování a oproti explantátům rostoucím na médiu B2 trpěly nekrotizací. Na všech médiích byla báze explantátů zduřelá a docházelo k vitrifikaci (Obr. 8).

Obr. 8: Vývoj explantátů *Pisum fulvum* WL 2140 na médiích B1, B2, B5 a B10 po 4 týdnech kultivace



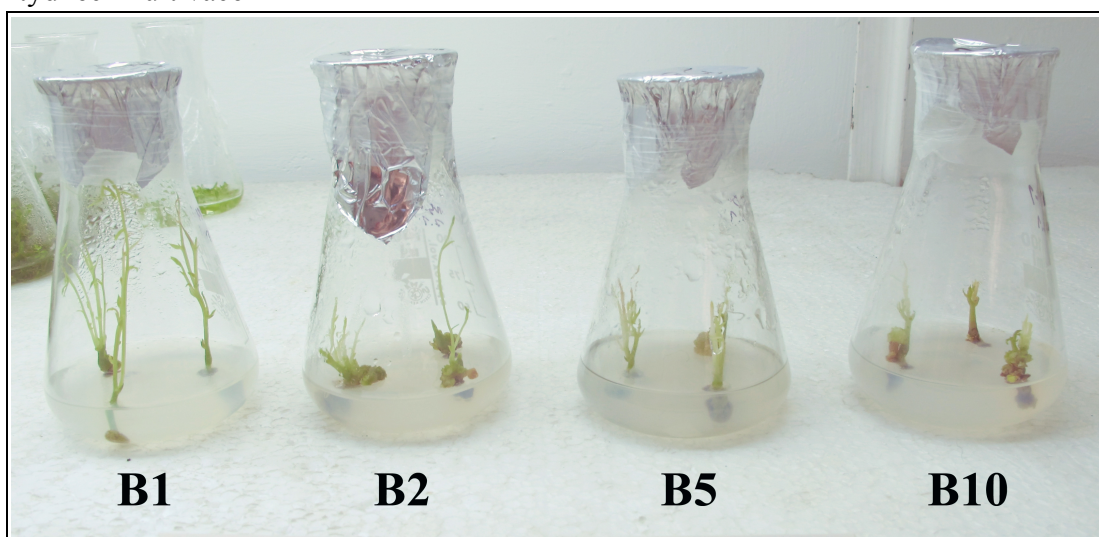
Genotyp *Pisum elatius* JI 1794 dosahoval optimálního zmnožení (3,3) a větvení (3,4) také na médiu B2 (Tab. 14). Na médiu B5 explantáty silně vitrifikovaly (Obr. 9) a během 4 týdnů kultivace 45 % explantátů vytrifikovalo úplně. Bez nekrotů a jen slabě vitrifikované byly explantáty na médiu B1.

Obr. 9: Vývoj explantátů *Pisum elatius* JI 1794 na médiích B1, B2 a B5 po 4 týdnech kultivace



Explantáty *Lathyrus clymenum* NS-01 dosahovaly nejvyššího zmnožení (3,7) a větvení (3,6) na médiu B5. Explantáty pěstované na médiích B1 a B2 měly internodia delší jak 1 cm. Na médiích B1, B2, B5 i B10 byla u všech explantátů pozorována tvorba kalusového valu na bázi a vitrifikace vrcholových částí (Obr. 10).

Obr. 10: Vývoj explantátů *Lathyrus clymenum* NS-01 na médiích B1, B2, B5 a B10 po 4 týdnech kultivace



Tab. 14: Srovnání kultivace explantátů na médiích B1, B2, B5 a B10 po 4 týdnech kultivace

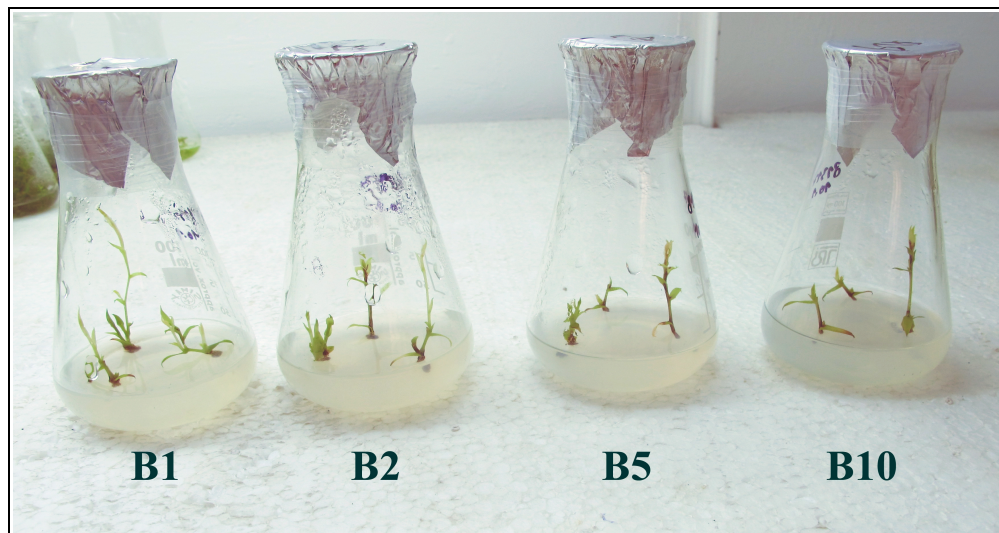
genotyp	médium	zmnožení*	kořenění*	větvení*	délka internodií (cm)	poznámka
<i>Pisum fulvum</i> WL 2140	B1	2,4	-	1,8	0,7	vitifikace vrcholových částí, zduřelá báze
	B2	2,5	-	2,3	0,6	vitifikace vrcholu, zduřelá báze
	B5	1,3	-	2,5	0,5	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, zduřelá báze
	B10	1,4	-	2,7	0,5	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, zduřelá báze
<i>Pisum elatius</i> JI 1794	B1	3	-	1,9	0,7	vitifikace vrcholových částí, zduřelá báze
	B2	3,3	-	3,4	0,5	vitifikace vrcholových částí, zduřelá báze
	B5	2,4	-	3,2	0,3	vitifikace celých rostlin, nekrózy v bazální části, zduřelá báze
<i>Lathyrus clymenum</i> NS-01	B1	2,4	-	2,2	1,5	vitifikace vrcholových částí, kalusový val u báze
	B2	2,9	-	3,2	1,2	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, kalusový val u báze
	B5	3,7	-	3,6	0,7	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, kalusový val u báze
	B10	1,7	-	2	0,5	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, kalusový val u báze
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	B1	3	-	2,5	0,8	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části, zduřelá báze
	B2	1,7	-	2,6	0,6	vitifikace vrcholových částí, nekrózy v bazální části a nodech, zduřelá báze
	B5	-	-	-	-	nekrózy celých rostlin
	B10	-	-	-	-	nekrózy celých rostlin

* na jeden explantát

Explantáty genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 na médiích B5 a B10 nekrotizovaly. Na médiích B1 a B2 byly patrné projevy nekrózy a vitifikace (*Obr. 11*), báze explantátů byla zduřelá. Většího zmnožení bylo dosaženo na médiu B1 (3). Na médiu B2

se explantáty více větvíly (2,6). Nové výhonky explantátů rostoucích na médiu B2 byly často příliš krátké a nebyly vhodné pro pasážování.

Obr. 11: Vývoj explantátů *Lathyrus ochrus* ATC81371 na médiích B1, B2, B5 a B10 po 4 týdnech kultivace



Během kultivace explantátů všech genotypů testovaných na médiích B1, B2, B5 a B10 nedošlo u žádného explantátu ke tvorbě kořínků. Při všech pokusech se také s rostoucí koncentrací BAP v médiu vždy zkracovala délka internodií.

Protože explantáty kultivované na médiích s BAP často tvořily množství výhonů, které byly pro samostatné pasážování krátké, byla u vybraných genotypů po 4 týdnech kultivace provedena pasáž celých explantátů na médiích B1, B2 a B5 na médium OK. Po 4 týdnech kultivace na médiu OK (Obr. 12), bylo dosaženo vyššího zmnožení oproti kultivaci explantátů na samotných médiích B1, B2 a B5 (Tab. 15).

Tab. 15: Zmnožení explantátů převedených na médium OK

genotyp	původní médium	zmnožení*
<i>Pisum elatius</i> JI 1794	B2	5,6
	B5	4,8
<i>Lathyrus clymenum</i> NS-01	B2	5,2
	B5	5,8
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	B1	4,1
	B2	5

* na jeden explantát a přepočteno na 4 týdny kultivace

Obr. 12: Stav vývoje explantátů *Lathyrus clymenum* NS-01 na médiu OK po 4 týdnech od přesazení z média B2



5.2.2 Vliv Alaru 85 a koncentrace hormonů v médiu na délku internodií

Po přidání růstového retardantu Alar do kultivačního média OK (médiu OKA) došlo u všech testovaných genotypů (*Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087 a *Lathyrus ochrus* ATC81371) ke zkrácení internodií. U žádného z genotypů se nevyskytovaly vitifikace ani nekrózy. Zmnožení a větvení explantátů bylo srovnatelné s výsledky na médiu OK (Tab. 16). Ke kořenění explantátů docházelo jen vyjimečně u genotypů *Pisum fulvum* WL 2140 a *Lathyrus ochrus* ATC81371.

Tab. 16: Srovnání explantátů kultivovaných na médiu OKA po 4 týdnech od pasáže

genotyp	zmnožení*	kořenění*	větvení*	délka internodií (cm)
<i>Pisum fulvum</i> WL 2140	1,9	0,1	1,2	0,6
<i>Pisum elatius</i> JI 1794	2	-	1,2	0,5
<i>Lathyrus clymenum</i> ATC81087	2,5	-	2,1	0,7
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	2,1	0,2	1,7	0,7

* na jeden explantát

Pro zkrácení internodií bylo u genotypu *Lathyrus clymenum* ATC81087 testováno také médium OK100 se stonásobně zvýšenými koncentracemi fytohormonů oproti médiu OK.

Internodia explantátů se oproti kultivaci na médiu OK zkrátily v průměru o 0,7 cm (Tab. 17), ale explantáty vitrifikovaly a listy se téměř nevyvíjely (Obr. 13). Ke kořenění explantátů nedocházelo.

Tab. 17: Hodnocení explantátů na médiu OK100 po 4 týdnech kultivace

genotyp	zmnožení*	kořenění*	větvení*	délka internodií (cm)	poznámka
<i>Lathyrus clymenum</i> ATC81087	2,4	-	2,2	1,2	vitřifikace celých rostlin

* na jeden explantát

Obr. 13: Stav explantátů *Lathyrus clymenum* ATC81087 po 4 týdnech na médiu OK100



5.2.3 Vliv antibiotik v kultivačním médiu OKatb na vývoj explantátů

Po několika pasážích se u všech explantátů začaly projevovat vnitřní bakteriální kontaminace, viditelné v kultivačním médiu. Proto byla do média OK přidána antibiotika (médiu OKatb) chloramphenicol (100 mg/l) a ampicilin (400 mg/l) (kap. 4.5.1). Použitá koncentrace antibiotik byla dostatečná pro odstranění kontaminací a explantáty kultivované na médiu OKatb nevykazovaly znatelné snížení zmnožení ani větvení. Po kvalitativní stránce se vyskytovala vitřifikace vrcholů.

5.3 Izolace a kultivace protoplastů

Jako další z metod byly testovány izolace protoplastů a jejich kultivace v tekutých

médiích. Protoplasty byly izolovány z listů a palistů genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* NS-01 a *Lathyrus ochrus* ATC81371 za účelem fúze protoplastů těchto genotypů s protoplasty kulturních odrůd hrachu setého (*Pisum sativum*). Pro možnost srovnání výsledků byla hustota protoplastů v 1 ml suspenze přepočtena na 1 g svěží hmoty.

5.3.1 Vliv cefotaximu na bakteriální kontaminace

Protože se při kultivaci explantátů genotypů použitých při izolaci protoplastů vyskytovaly vnitřní bakteriální kontaminace, byly explantáty před zkoušením izolačních postupů kultivovány na médiu OKatb (kap. 5.2.3). Bylo také testováno použití antibiotika cefotaximu přímo v enzymatickém roztoku ENZ 2 bez předchozí kultivace explantátů na médiu OKatb. Použitá koncentrace cefotaximu 150 mg/l nebyla dostatečná pro úplné odstranění bakteriální kontaminace.

5.3.2 Vliv doby působení enzymatického roztoku

Pro optimalizaci doby působení enzymatického roztoku, s ohledem na hustotu a životnost získaných protoplastů, byly testovány časy 14 h, 16 h a 18 h. Při těchto experimentech byla použita preplazmolýza a enzymatický roztok ENZ 2. Nejvyšší hustoty a životnosti získaných protoplastů bylo u všech genotypů dosaženo při působení enzymatického roztoku po dobu 14 h (Tab. 18). Při působení enzymatického roztoku po dobu 16 h byla hustota získaných protoplastů v průměru o 36 % nižší a při působení po dobu 18 h klesla hustota izolovaných protoplastů v průměru o 64 %. U všech následujících experimentů byla proto použita doba působení enzymatického roztoku 14 h.

5.3.3 Vliv složení enzymatického roztoku a izolačního postupu

Pro natrávení rostlinných pletiv byly použity 3 enzymatické roztoky – ENZ 1, ENZ 2 a ENZ 3 (kap. 4.6.2, Tab. 9). Na proužky nařezané listy a palisty byly nejprve vloženy do přeplazmolytického roztoku (PGly a CPW13), který byl poté nahrazen enzymatickým roztokem. Všechny zjištěné hodnoty hustoty protoplastů byly přepočteny na 1 g svěží hmoty použitého rostlinného materiálu.

Nejvyšší hustoty protoplastů a jejich nejlepší životnosti bylo u všech genotypů dosaženo při použití izolačního postupu ENZ 2 (Tab. 18). Nejvyšší hustoty protoplastů ($4,60 \times 10^5/\text{ml}$) se u tohoto postupu podařilo získat u genotypu *Pisum elatius* IJ 1794. Nejlepší životnost (71,12 %) vykazovaly protoplasty genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01. Při použití izolačního postupu ENZ 1 se u genotypu *Pisum elatius* 1794 podařilo získat $0,46 \times 10^5/\text{ml}$

protoplastů. Pro genotypy *Lathyrus clymenum* NS-1 a *Lathyrus ochrus* ATC81371 nebyl vhodný, protože se protoplasty získat nepodařilo. Při použití postupu ENZ 3 se protoplasty podařilo získat u všech testovaných genotypů.

5.3.4 Vliv preplazmolýzy

U všech tří genotypů byl testován vliv preplazmolýzy na hustotu a životnost izolovaných protoplastů při použití enzymatického roztoku ENZ 2 (Tab. 18). Bez použití preplazmolýzy klesla u genotypu *Pisum elatius* IJ 1794 hustota protoplastů o $3,24 \times 10^5/\text{ml}$ a jejich životnost o 29,63 %. U genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01 se bez preplazmolýzy nepodařilo protoplasty získat. Hustota protoplastů klesla bez použití preplazmolýzy u genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 o $2,63 \times 10^5/\text{ml}$ a jejich životnost se snížila o 33,92 %.

Tab. 18: Hustota protoplastů a jejich životnost u genotypů *Pisum elatius* 1794, *Lathyrus clymenum* NS-1 a *Lathyrus ochrus* ATC81371 při působení enzymatického roztoku po dobu 14 h

genotyp	izolační postup	preplazmolytický roztok	hustota * protoplastů ($\times 10^5/\text{ml}$)	životnost protoplastů (%)
<i>Pisum elatius</i> IJ 1794	ENZ 1	+	0,46	52,61
	ENZ 2	+	4,60	61,84
		-	1,36	32,21
	ENZ 3	+	1,57	36,36
<i>Lathyrus clymenum</i> NS-01	ENZ 1	+	0	0
	ENZ 2	+	3,89	71,12
		-	0	0
	ENZ 3	+	1,22	49,94
<i>Lathyrus ochrus</i> ATC81371	ENZ 1	+	0	0
	ENZ 2	+	3,50	70,00
		-	0,87	36,08
	ENZ 3	+	2,15	48,84

* hustota protoplastů v 1 ml suspenze přepočtena na 1 g výchozí svěží hmoty

5.3.5 Kultivace protoplastů

U izolovaných protoplastů, které byly následně kultivovány v kultivačních médiích Y a Z, nebylo pozorováno dělení buněk ani resyntéza buněčné stěny. Při hodnocení

po 4 dnech kultivace byla většina protoplastů plazmolyzována, po 8 dnech již byly plazmolyzovány všechny protoplasty.

6 Diskuze

Biotechnologické metody jsou stále používané a rozvíjené metody základního výzkumu, které jsou aplikované pro praktické účely. Metody mikropropagace a protoplastových kultur lze využít ve šlechtění rostlin, záchranných programech nebo k produkci sekundárních metabolitů.

6.1 Povrchová sterilizace a klíčení semen

Optimalizace povrchové sterilizace explantátů určených k mikropropagaci je prvním klíčovým krokem k založení aseptické kultury. Její optimalizace je důležitá nejen pro úspěšnou mikropropagaci, ale také kvůli šetrnému nakládání s použitým rostlinným materiálem, kterého je u ohrožených a endemitických druhů dostupné jen omezené množství.

Při povrchové sterilizaci semen bobovitých (*Fabaceae*) se nejčastěji používají chlorid rtuťnatý (HgCl_2) a chlornan sodný (NaOCl), který je i součástí komerčního přípravku SAVO. Chlorid rtuťnatý použili pro povrchovou sterilizaci hrachu setého (*Pisum fulvum*) a zástupců rodu hrachor (*Lathyrus* sp.) úspěšně Barik a kol. (2004, 2005), Klčová a Gubišová (2003) a Supe a Roymond (2011). Vzhledem k tomu, že se však jedná o velmi prudký jed vstřebávající se i kůží a byly u něj zaznamenány teratogenními účinky, nebylo jeho použití pro účely této práce uvažováno. Chlornan sodný o 5% koncentraci s dobou působení 15 min použil pro povrchovou sterilizaci semen genotypu *Lathyrus ochrus* úspěšně Saglam (2012). U hrachu setého (*Pisum fulvum*) si pro založení aseptické kultury vystačily Tzitzikas a kol. (2004) s 1,6% koncentrací chlornanu sodného a Zhihui a kol. (2009) dokonce jen s 0,5% roztokem chlornanu sodného. Koncentrace chlornanu sodného v 36% roztoku SAVA, který byl použit v této práci, byla 1,8 %.

Při povrchové sterilizaci semen se běžně používají i přípravky chloramin B a SAVO (Knitl 2011). Roztok chloraminu B byl málo účinný, protože se následně projevovaly kontaminace testovaných semen. Při použití 36% SAVA se kontaminace neprojevovaly.

Oba přípravky měly vliv také na klíčivost semen. U genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Lathyrus ochrus* ATC81371, *Lathyrus clymenum* ATC81087 a *Lathyrus clymenum* NS-01 bylo nejlepších výsledků dosaženo s 36% SAVEM působícím po dobu 40 min. Při kratší době působení přípravku klesalo množství vyklíčených semen, u genotypu *Lathyrus clymenum* ATC81087 při době působení 20 min až o 30 %. Stejně tak při použití chloraminu B bylo u testovaných genotypů množství vyklíčených semen oproti postupu s 36% SAVEM nižší o 10-20 %. Vliv sterilizačních roztoků na klíčivost semen byl pravděpodobně způsoben

narušením pevného osemení. Vzhledem k výsledkům uvedeným v *Tab. 11 (kap. 5.1)* zůstává prostor pro testování dalších postupů za účelem zvýšení klíčivosti semen u genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus neurolobus* 20080542.

Optimál klíčivosti při použití 36% SAVA bylo dosaženo u genotypů *Lathyrus clymenum* NS-01 (97 % vyklíčených semen) a *Lathyrus clymenum* ATC81087 (90 % vyklíčených semen).

Oba použité způsoby ožívování semen u genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 byly bez účinku na zvýšení klíčivosti semen. U genotypu *Lathyrus neurolobus* 20080542 se podařilo získat semenáček až při výsevu semen na médium MS.

Jako substrát pro klíčení semen hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*) použili médium MS také Klčová a Gubišová (2003). Uvádějí, že klíčivost semen tím vzrostla o 30-43 % v závislosti na genotypu. Malik a kol. (1992) uvádí 80% klíčivost semen genotypu *Lathyrus ochrus* při ošetření koncentrovanou kyselinou sírovou po dobu 1 min a následném vysetí na médium MS, což je o 30 % víc, než se podařilo získat u stejného druhu v našem případě. Tipathy a kol. (2014) dosáhli u hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) 97% klíčivosti při výsevu semen na médium MS o poloviční koncentraci bazálních solí, což bylo o 28 % více, než když použili médium MS o plné koncentraci bazálních solí.

Právě použití média MS o různých koncentracích bazálních solí místo filtračního papíru navlhčeného destilovanou vodou by mohlo mít pozitivní vliv na klíčení semen i u dalších genotypů, např. *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794 nebo *Lathyrus ochrus* ATC81371.

Jedním z hlavních problémů při klíčení semen rodů hrachor (*Lathyrus* sp.) a hrách (*Pisum* sp.) je jejich pevné osemení, často s vysokým obsahem fenolických látek. Klčová a Gubišová (2003) použily pro narušení osemení hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*) koncentrovanou kyselinu sírovou, do které vložily semena na dobu 15 min. Uvádějí, že klíčivost semen stoupla v některých případech až o 80 % v závislosti na genotypu a substrátu na který byla semena vyseta. Skarifikace semen kyselinou sírovou je další možností, jak zvýšit klíčivost semen genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus neurolobus* 20080542.

6.2 Mikropropagace

Mikropropagace je explantátová technika množení rostlin ve sterilním prostředí za přesně definovaných podmínek. Díky této metodě je možné získat v krátkém čase velké

množství nových jedinců, kteří mají velkou míru genetické uniformity (jsou geneticky shodní s mateřskou rostlinou – variabilita je dána především počtem mateřských rostlin, ze kterých byl materiál odebírán). Vzhledem k tomu, že jsou *in vitro* pěstované rostliny zbaveny patogenů a na povrchu nemají vytvořenu kutikulu, jsou ideálním zdrojem materiálu pro protoplastové kultury a následnou somatickou hybridizaci (fúze protoplastů). Postupy mikropropagace jsou pro jednotlivé genotypy odlišné a stanovují se empiricky. V této práci byl testován vliv BAP o koncentracích 1; 2,5; 5 a 10 mg/l na vývoj explantátů.

Vliv BAP o koncentracích 5 a 10 mg/l na vývoj různých genotypů hrachu setého (*Pisum sativum*) s použitím bazálního média MSB sledovali i Espósito a kol. (2012). Z výsledků jejich práce je patrná silná závislost množení na genotypu. Zatím co u genotypu Viper uvádí při koncentraci BAP 5 mg/l množení 31,5 na rostlinu, u kultivaru Canada A při stejné koncentraci BAP zaznamenali množení 8,17 na rostlinu. Pro experimenty použily celá semena. Franklin a kol. (2000) dosáhli u kultivaru hrachu setého (*Pisum sativum*) PID nejlepšího množení (32 na rostlinu) při koncentraci 2 mg/l BAP v médiu MS. Pro experimenty také použili celá semena. Barik a kol. (2004) uvádějí u kultivaru *Lathyrus sativus* IC-120487 množení 11,3 na rostlinu při koncentraci 2 mg/l BAP v médiu MS.

Nejlepší množení, jakého se podařilo dosáhnout v této práci při použití apikálních vrcholů a nodálních segmentů jako explantátů, bylo 3,7 u genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01. To je mnohem méně, než v uvedených výzkumech. Následnou pasáží celých explantátů na médium OK se nám podařilo získat u stejného genotypu množení 5,8, což bylo dáno prorůstáním pupenů, které byly jinak pro samostatnou pasáž příliš malé. Oproti uvedeným autorům je to množení stále nízké. Jednou z možností jak dosáhnout lepších výsledků by mohla být změna bazálního média z MS na MSB (Espósito a kol. 2012, Franklin a kol. 2010).

Podle Tzitzikas a kol. (2004) je možné dosáhnout dobrých výsledků také při kombinaci BAP a GA₃ v médiu. Při koncentracích 1 mg/l BAP a 1mg/l GA₃ dosáhli u kultivaru hrachu setého (*Pisum sativum*) Espace množení 20 na rostlinu a u kultivaru hrachu setého (*Pisum sativum*) Puget dokonce množení 22 na rostlinu. I přidání GA₃ do médií obsahujících BAP by mohlo vést ke zlepšení dosažených výsledků množení.

Dále byl testován účinek růstového retardantu Alar 85 za účelem zkrácení internodií kultivovaných explantátů. Kepenek a Karoglu (2011) uvádějí u explantátů různých genotypů jabloně domácí (*Malus domestica*) průměrné zkrácení internodií o 6±1 mm, při použití Alaru 85 v médiu o koncentraci 1 mg/l. Zároveň při této koncentraci došlo k tvorbě většího množství prýtů na explantát. V průměru to bylo o 1 prýt na explantát více. Podle

Sharma a Mohan (2006) má Alar 85 také pozitivní vliv vzhledem ke vzniku vitifikací. U *Chlorophytum borivillianum* rostli explantáty díky Alaru 85 o koncentraci 1,5 mg/l tmavě zelené, bez vitifikace. U již vitifikovaných explantátů se při této koncentraci Alaru 85 podařilo vrátit k normálnímu růstu 2 % explantátů.

Při naší použité koncentraci Alaru 85 (1,5 mg/l) došlo ke zkrácení internodií o 0,3 mm (*Pisum elatius* JI 1794) - 1,1 mm (*Lathyrus clymenum* ATC81087) na explantát v závislosti na genotypu. Větvení vzrostlo o 0,1-0,3 prýtů na explantát. Vitifikace se u explantátů neprojevovala. Při použití média OK100 u genotypu *Lathyrus clymenum* ATC81087 došlo ke zkrácení internodií o 7 mm, explantáty vitifikovaly a listy se téměř nevyvíjely. Použití Alaru 85 v koncentraci 1,5 mg/l bylo proto vyhodnoceno jako vhodnější ke zkrácení internodií, než zvyšování koncentrace fytohormonů v médiu.

Knitl (2011) uvádí použití antibiotik ampicilinu (400 mg/l) a chloramphenicolu (100 mg/l) při mikropropagaci explantátů vrby bílé (*Salix alba*) a vrby matsudovy (*Salix matsudana*) bez zjevného vlivu na výskyt kontaminací. V této práci bylo při použití stejných antibiotik o stejné koncentraci dosaženo čistých aseptických kultur bez viditelných známek kontaminace. U explantátů se ovšem projevovala vitifikace vrcholů. Podle Knitl (2011) je možné použít pro odstranění vnitřních kontaminací explantátů prostředku PPM (Plant Preservative Mixture), který při koncentraci 0,1 % nemá vliv na výskyt vitifikace a nekróz u explantátů.

6.3 Izolace a kultivace protoplastů

Protoplastové kultury v kombinaci s technikami fúze protoplastů jsou v současné době moderní a vhodnou metodou pro získávání nových mezidruhových hybridů. Především v případech, kdy jsou konvenční metody těžko uplatnitelné (např. u druhů s výrazně odlišnou dobou kvetení) je tento způsob šlechtění nových odrůd nenahraditelný.

Při mikropropagaci explantátů všech genotypů použitých v této práci se vyskytovaly vnitřní kontaminace viditelné v agarovém médiu, které následně znemožňovaly izolaci a kultivaci protoplastů. Byly testovány dva způsoby jak tento problém vyřešit. Buď byla přidána antibiotika do kultivačního média explantátů a ty byly zbaveny kontaminace ještě před vložením rostlinného materiálu do enzymatického roztoku (*viz. kap. 6.2*), nebo bylo použito antibiotika cefotaximu o koncentraci 150 mg/l přímo v enzymatickém roztoku.

Podle Grzebelus a Skop (2014) je možné použít v protoplastových kulturách mrkve obecné (*Daucus carota*) cefotaxim o koncentraci 100-500 mg/l, aniž by byla tato koncentrace toxická pro protoplasty a ovlivňovala jejich regeneraci. Přitom uvádí odstranění

všech kontaminací, které se v protoplastových kulturách mrkve obecné (*Daucus carota*) vyskytovaly. Koncentrace cefotaximu použitá v našem případě (150 mg/l) nebyla dostatečná k odstranění vyskytujících se bakteriálních kontaminací. Vzhledem k výsledkům Grzebelus a Skop (2014) by mohlo pomoci zvýšení koncentrace cefotaximu v médiu až po hranici 500 mg/l.

Správné stanovení ideální doby působení enzymatického roztoku na rostlinný materiál je důležité, protože při krátkém působení se neuvolní dostatečné množství protoplastů a při příliš dlouhém působení dochází k lýzi uvolněných protoplastů. Bhadra a kol. (1994) získali u *Vigna sublobata* hustoty protoplastové kultury 2.25×10^5 /ml při době působení enzymatického roztoku 16-18 h. Durieu a Ochatt (2000) získali u hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) koncentraci protoplastové suspenze 2×10^5 /ml při působení enzymatického roztoku po dobu 14h. Huang a kol. (2013) nechali enzymatický roztok působit na mezofyl okurky seté (*Cucumis sativus*) po dobu 8-10 h a získali $6,5 \times 10^5$ /ml protoplastů. Všechny uvedené hodnoty jsou vztaženy na 1 g svěží hmoty použitého rostlinného materiálu.

V této práci se podařilo dosáhnout nejlepšího výsledku při působení enzymatického roztoku po dobu 14 h. Nejvyšší hustoty protoplastů tak bylo dosaženo u genotypu *Pisum elatius* IJ 1794, a to $4,6 \times 10^5$ protoplastů v 1 ml média.

Preplazmolýza rostlinného materiálu určeného pro izolaci protoplastů se používá pro snížení množství vody v buňkách. Protoplasty nechráněné buněčnou stěnou totiž nejsou chráněny proti nadměrnému nasávání vody z roztoku a mohlo by tak dojít k jejich popraskání. Preplazmolýza tak může zvyšovat životnost protoplastů v enzymatickém roztoku. Preplazmolýzu ve své práci použili a její pozitivní vliv na množství získaných protoplastů zaznamenali Durieu a Ochatt (2000) u hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) a hrachu setého (*Pisum sativum*). Jako plazmolytikum použili roztok CPW, doplněný u hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) o 13% mannitol a u hrachu setého (*Pisum sativum*) o 9% mannitol. Bhadra a kol. (1994) použili u *Vigna sublobata* jako plazmolytikum taktéž roztok CPW doplněný o 13% mannitol. Stejný plazmolytický roztok byl použit i v této práci. Bez jeho použití klesla hustota získaných protoplastů u genotypu *Pisum elatius* IJ 1794 o $3,24 \times 10^5$ /ml protoplastů, u genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 o $2,63 \times 10^5$ /ml protoplastů a u genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01 se bez preplazmolýzy protoplasty nepodařilo získat.

Dalším podstatným krokem při izolaci protoplastů je natrávení buněčných stěn v enzymatickém roztoku. Ten se skládá z celuláz, pektolýz a macerozymů. Jejich vyvážená koncentrace zajišťuje dostatečné natrávení buněčných stěn pro uvolnění protoplastů a minimální poškození uvolněných protoplastů. Používané druhy enzymů se mohou výrazně

lišit svou enzymatickou aktivitou. Optimální pro izolaci protoplastů hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) uvádějí Durieu a Ochatt (2000) směs 3% macerozymu R-10, 4% celulázy Onozuka RS a 0,2% pektolyázy Y-23 a pro hrách setý 2% macerozym R-10, 5% celulázu a 0,1% pektolyázu Y-23. Yan-Xiu a kol. (1995) použili pro *Sesbania bispinosa* směs 3,5% celulázu Onozuka R-10, 1% macerozymu a 0,5% hemicelulázy.

V našem případě se u všech tří použitých genotypů ukázala jako nejvhodnější kombinace enzymů 1% celuláza R-10 Onozuka, 0,1% pektolyáza Y-23 a 0,9% macerozym R-10. Při použití této enzymatické směsi (ENZ 2) byla u izolovaných protoplastů všech genotypů získána nejvyšší hustota i životnost.

Při kultivaci protoplastů na námi zvolených médiích (Y, Z) došlo u všech do 8 dnů k plazmolýze. Médiu Y použili ve své práci i Yan-Xiu a kol. (1995). U *Sesbania bispinosa* na tomto médiu zaznamenali tvorbu kalusu u 84 % protoplastů. Sotiriou a kol. (2007) použili médium shodné s médiem Z. Na tomto médiu zaznamenali regeneraci protoplastů *Ceratonia siliqua*. Durieu a Ochatt (2000) použili při kultivaci protoplastů hrachoru setého (*Lathyrus sativus*) a hrachu setého (*Pisum sativum*) úspěšně médium KM, doplněné o 0,1 mg/l 2,4-D, 0,2 mg/l ZEA a 1 mg/l NAA. Toto médium by mohlo být pro protoplasty genotypů použitých v této práci vhodné.

7 Závěr

Předkládaná práce se zabývá mikropropagací, izolací protoplastů a jejich kultivací u genotypů *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus clymenum* ATC81087, *Lathyrus clymenum* NS-01, *Lathyrus neurolobus* 20080542 a *Lathyrus ochrus* ATC81371. Závěrem lze konstatovat, že:

- 1) Byla vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku mikropropagace, izolace protoplastů a jejich kultivace u čeledi *Fabaceae* se zaměřením na rody hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.).
- 2) Na základě literární rešerše byly navrženy materiály a metody potenciálně vhodné pro mikropropagaci, izolaci protoplastů a kultivaci protoplastových kultur rodů hrách (*Pisum* sp.) a hrachor (*Lathyrus* sp.).
- 3) Byl stanoven postup pro založení aseptické kultury s pomocí 36% roztoku přípravku SAVO působícího po dobu 40 min. Klíčivost semen při tomto postupu byla 60% u *Pisum fulvum* WL 2140, 40% u *Pisum elatius* JI 1794, 90% u *Lathyrus clymenum* ATC81087, 97% u *Lathyrus clymenum* NS-01 a 50% u *Lathyrus ochrus* ATC81371.
- 4) GA₃ nemá vliv na klíčivost semen *Lathyrus ochrus* ATC81371.
- 5) Optimálním kultivačním médiem pro genotypy *Pisum fulvum* WL 2140, *Pisum elatius* JI 1794 a *Lathyrus ochrus* ATC81371 bylo médium B2 (BAP 2,5 mg/l), pro genotyp *Lathyrus clymenum* NS-01 to bylo médium B5 (BAP 5 mg/l).
- 6) Nejlepšího zmnožení bylo dosaženo při následné pasáži celých explantátů z médií B2 a B5 na médiu OK (BAP 0,01 mg/l; IBA 0,01 mg/l).
- 7) Bylo stanoveno vhodné složení antibiotik v kultivačním médiu pro odstranění vnitřních kontaminací (ampicilin 400 mg/l; chloramphenicol 100 mg/l).
- 8) Při koncentraci Alaru 85 1,5 mg/l byla zkrácena délka internodií explantátů kultivovaných *in vitro*.

- 9) Byl potvrzen pozitivní vliv preplazmolýzy na hustotu a životnost protoplastů u genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01.
- 10) Optimální enzymatický roztok pro izolaci protoplastů z mezofylu genotypů *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01 byl roztok ENZ 2. Optimální doba působení enzymatického roztoku byla 14 h. Při použití preplazmolýzy bylo dosaženo u genotypu *Pisum elatius* JI 1794 hustoty protoplastů (přepočteno na 1 g svěží mezofylové hmoty) $4,60 \times 10^5/\text{ml}$, u genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 hustoty protoplastů $3,50 \times 10^5/\text{ml}$ a u genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01 hustoty protoplastů $3,89 \times 10^5/\text{ml}$. Při tomtéž postupu byla životnost protoplastů 61,84 % u genotypu *Pisum elatius* JI 1794, 70 % u genotypu *Lathyrus ochrus* ATC81371 a 71,12 % u genotypu *Lathyrus clymenum* NS-01.
- 11) Pro genotypy *Pisum elatius* JI 1794, *Lathyrus ochrus* ATC81371 a *Lathyrus clymenum* NS-01 je potřeba optimalizovat metody izolace a kultivace protoplastů.

8 Použitá literatura

1. Aslam, M.; Arif, M.; Pandey, K. L.; Singh, N. K.; Kumar, N.; Das, S. C. (2006). Studies on *in vitro* regeneration pea (*Pisum sativum* L.) var. Arkel. Biochem. Cell. Arch. vol.6, no. 1, pp. 111-116
2. Barik, D. P.; Naik, S. K.; Mohapatra, U.; Chand, P. K. (2004). High-frequency plant regeneration by *in vitro* shoot proliferation in cotyledonary node explants of grasspea (*Lathyrus sativus* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40:467-470 (2004)
3. Barik, D. P.; Mohapatra, U.; Chand, P. K. (2005). High frequency *in vitro* regeneration of *Lathyrus sativus* L. Biol. Plant. 49: 637-639
4. Bergmeier, E.; Abrahamczyk, S. (2007). Ecology and distribution of the Aegean wetland endemics *Carex cretica* and *Lathyrus neurolobus*. Nova Hedwigia, Beiheft 131, p. 207-219
5. Bhadra, S. K.; Hammatt, N.; Power, J. B.; Davey M. R. (1994). A reproducible procedure for plant regeneration from seedling hypocotyl protoplasts of *Vigna sublobata* L. Plant Cell Reports (1994) 14:175-179
6. Blaydes, D. F. (1966). Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Pl. 19:748-753
7. Bogler, D. (2010). *Pisum fulvum* Tawny pea – Physical description. Encyclopedia of Life, http://eol.org/data_objects/6657481
8. Cronquist, A. (1988). The evolution and systematics of flowering plants. Ed. 2. - New York
9. Dhir, S. K.; Dhir, S.; Widholm, J. M. (1991). Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). Plant Cell Reports 10:39-43
10. Duro, A.; Piccione, V.; Zampino, D. (2012). Air quality biomonitoring through pollen viability of fabaceae. Environ Monit Assess 185:3803-3817

11. Durieu, P.; Ochatt, S. J. (2000). Efficient intergeneric fusion of pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protoplasts. Jour.of Exp. Bot., Vol. 51, No. 348, pp. 1237-1242
12. Espósito, M. A.; Almirón, P.; Gatti, I.; Cravero, V. P.; Anido, F. S. L.; Cointry, E. L. (2012). A rapid method to increase the number of F1 plants in pea (*Pisum sativum*) breeding programs. Gen. and Mol. Res. 11 (3):2729-2732 (2012)
13. Fielding, J., Turland, N. (2005). Flowers of Crete. Royal botanic garden, Richmond
14. Franklin, G.; Pius, P. K.; Ignacimunthu, S. (2000). Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). Euphytica 115:65-73
15. Frearson, E. M.; Power, J. B.; Cocking, E. C. (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev. Biol. 33:130-137
16. Fujioka, T.; Fujita, M.; Iwamoto, K. (2000). Plant regeneration of Japanese pea cultivars by *in vitro* culture of immature leaflets. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.69: 656-658
17. Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Expt. Cell Res. 50:151-158
18. Griga, M.; Tejklova, E.; Novak F.J.; Kubalaková M. (1986). *In vitro* clonal propagation of *Pisum sativum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 95–104
19. Griga, M. (1990). Biotechnologie ve šlechtění hrachu – stav a perspektivy. Sb. z konf. o šlech. a pěst. hrachu, Brno 1990
20. Grulich, V. (2011). *Pisum sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. et Graebn. – hrách setý / hrách siaty. <http://botany.cz/cs/pisum-sativum-elatius/>
21. Grzebelus, E.; Skop, L. (2014). Effect of β -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant
22. Gulati, A.; Jaiwal, P. K. (1990). Culture conditions effecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23:1-7

23. Henry, M. A.; Nikolopoulou, D.; Alexis, M. N. (2012). *In vitro* effect of peas, *Pisum pisum*, and chickpeas, *Cicer arietinum*, on the immune system of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* (2012) 48:407-412
24. Heywood, V. H.; Brummit, R. K.; Culham, A.; Seberg, O. (2007). Flowering plant families of the world. Firefly Books, Ontario
25. Hochman, M.; Hosnedl, V. (1997). Hlavní směry výzkumu hrachu. *Úroda*, 1997, 3:17
26. Hradilík, J. (2005). Rostlinné explantáty. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
27. Kao, K. N.; Michayluk, M. R. (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplast at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105–110
28. Kao, K. N. (1977). Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean–*Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150: 225–230
29. Kenicer, G.; Norton, S. (2008). 631. *LATHYRUS NEUROLOBUS*. *Curtis's Botanical Magazine*, 25: 310–316
30. Kepenek, K.; Karoglu, Z. (2011). The effects of paclobutrazol and daminozide on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. *Afr. Jour. of Biotech.* Vol. 10(24), pp. 4851-4859 (2011).
31. Khan, S.; Ahmad, M.; Fida, M. D. M.; Swati, Z. A. (2010). *In vitro* micro-propagation of indigenous chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, KK-1 and Hassan-2K. *Afr. Jour. of Agric. Research* Vol. 5(21), pp. 2934-2938 (2010)
32. Klčová, L.; Gubišová, M. (2003). Utilisation of *in vitro* techniques in rescue of gene resources of Meadow vechtling (*Lathyrus pratensis* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39, 2003 (3):84-88
33. Knitl, M. (2011). Využití mikropropagace u vybraných druhů ohrožených dřevin.

34. Kosturkova, G.; Mahandjiev A.; Dobрева T.; Tzvetkova, V. (1997). Regeneration systems for immature embryos of Bulgarian pea genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 139–142
35. Kováč, J. (1995). *Explantátové kultury rostlin*. Univerzita Palackého, Olomouc
36. Kysely, W.; Jacobsen, H. J. (1990). Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20:7-14
37. Lafranchis, T. (2009). *Flowers of Greece - volume I*. Diatheo, Paris
38. Linsmaier, E. M.; Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18:100-127
39. Malik, K. A.; Khan, S. T. A.; Saxena, P. K. (1992). Direct organogenesis and plant regeneration in preconditioned tissue cultures of *Lathyrus cicera* L., *L. ochrus* (L.) DC. and *L. sativus* L. *Ann. Bot.* 70: 301-304
40. Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
41. Novák, F. J. (1990). *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia, Praha
42. Ochatt, S. J.; Durieu, P.; Jacas, L.; Pontécaille, C. (2001). Protoplast, cell and tissue cultures for the biotechnological breeding of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Lathyrus Lathyrism Newsletter* 2 (2001)
43. Ochatt, S. J.; Conreux, C.; Jacas, L. (2013). Flow cytometry distinction between species and between landraces with *Lathyrus* species and assessment of true-to-typeness of in vitro regenerants. *Plant. Syst. Evol.* (2013) 299:75-85
44. Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro Culture of higher plants*. Martinus Nijhoff publishers

45. Pniewsky, T.; Wachowiak, J.; Kapusta, J.; Legocki, A. (2003). Organogenesis and long-term micropropagations polish pea cultivars. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72: 295-302
46. Rajput V.; Singh N. P. (2010). Studies on *in vitro* regeneration and direct organogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 15: 246-249
47. Saglam, S. (2012). Plant regeneration from pulse-treated longitudinally sliced half cotyledon node explants of turkish ochrus chickling (*Lathyrus ochrus* (L.) D. C.). *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64 (2), 525-529, 2012
48. Sahin-Demirbag, N.; Kendir, H.; Khawar, K. M.; Ciftci, C. Y. (2008). *In vitro* regeneration of Turkish dwarf chickling (*Lathyrus cicera* L) using immature zygotic embryo explant. *Afr. Jour. of Biotech.* vol. 7 (12), pp. 2030-2033
49. Sharma, R.; Kaushal, R. P. (2004). Generation and characterization of pea (*Pisum sativum*) somaclones for resistance to *Ascochyta* blight and powdery mildew. *Indian Jour. of Biotech.*, Vol. 3, July 2004, pp 400-408
50. Sharma, U.; Mohan, J. S. S. (2006). Reduction of vitrification in *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivillianum* Sant. and Fernand., a rare potent medicinal herb. *Indian Jour. of Exp. Biol.* Vol. 44, pp. 499-505
51. Schenk, R. U.; Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
52. Schaefer, H.; Hechenleitner, P.; Santos-guerra, A.; Menezes de Sequeira, M.; Pennington, R. T.; Kenicer, G.; Carine, M. A. (2012). Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe fabaeae with special focus on the middle-atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology* 12:250
53. Sinha, A.; Wetten, A. C.; Caligari, P. D. S. (2003a). Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. *Aust. Jour. of Bot.* 51:103-109
54. Sinha, A.; Wetten, A. C.; Caligari, P. D. S. (2003b). Optimization of protoplast

- production in white lupin. *Biol. Plant.* 47:21-25
55. Slavík, B (1995). *Květena České republiky 4*. Academia, Praha
56. Smýkal, P.; Valledor, L.; Rodriguez, R.; Griga, M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* (2007) 26:1987-1998
57. Smýkal, P.; Kenicer, G; Flavell, A. J.; Corander, J.; Kosterin, O.; Redden, R. J.; Ford, R.; Coyne, C. J.; Maxted, N.; Ambrose, M. J.; Ellis, N. T. H. (2011). Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* (2011) 9(1); 4-18
58. Sotiriou, P.; Fry, S. C.; Spyropoulos, C. G. (2007). Protoplast isolation and culture from carob (*Ceratonia siliqua*) hypocotyls: ability of regenerated protoplasts to produce mannose-containing polysaccharides. *Physiol. Plant.* 2007
59. Supe, U.; Roymond, M. G. (2011). Micropropagation of radiated seeds of *Pisum sativum*. *Indian Jour. of Fund. and App. Life Sci.* vol. 1 (4), 203-208
60. Šuška, M.; Stejskal, J. (1992). The elektrophoretic identifikation of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars by seed protein analysis. *Rostl. výr.*, 38:203-208
61. Šuška, M. (1993). Izoenzymy listů hrachu (*Pisum*) a jejich využití při identifikaci odrůd. *Gen. a šlecht.*, 1:55-58
62. Tripathy, S. K.; Swain, D.; Mishra, P. K.; Baisakh, B.; Dash, S. (2014). Optimization of callus induction in *Lathyrus sativus* L. *Afr. jour. of Food Sci. and Tech.*, vol. 5(3), 60-66
63. Tzitzikas, E. N.; Bergervoet, M.; Raemakers, K.; Vincken, J.-P.; Van Lammeren, A.; Visser, R. G. F. (2004). Regeneration fo pea (*Pisum sativum* L.) by cyclic organogenic system. *Plant Cell Rep* (2004) 23:453-460
64. Wiszniewska, A.; Pindel, A. (2010). Protoplast culture utilization in studies on legume

- crops. Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil and Plant Science 60:389-399
65. White, P. R. (1963). The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York
66. Xiao, L.; Koster, K. L. (2001). Desiccation tolerance of protoplasts isolated from pea embryos. Jour. of Exp. Bot. 52:2105-2114
67. Yan-Xiu, Z.; Harris, P. J. C.; Dun-YI, Y. (1995). Plant regeneration from protoplasts isolated from cotyledons of *Sesbania bispinosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 119-123
68. Zelený, V. (2012). Rostliny středozemí. 2. vydání, Academia, Praha
69. Zhihui, S.; Tzitzikas, M.; Raemakers, K.; Zhengqiang, M.; Visser, R. (2009). Effect of TDZ on plant regeneration from mature seeds in pea (*Pisum sativum*). In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant (2009) 45:776-782

Internetové zdroje

- 1) http://www.mittelmeerflora.de/Zweikeim/Fabaceae/lath_blau_klein.htm
- 2) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/af/Lathyrus_clymenum2.JPG
- 3) <http://luirig.altervista.org/cpm/albums/bot-052/lathyrus-ochrus1076.jpg>
- 4) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/Pisum_fulvum.JPG
- 5) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Pisum_sativum_elatius_1.jpg
- 6) http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=pifu_001_ahp.tif
- 7) <http://web3.wzw.tum.de/oscar/wiki/images/9/9f/L.ochusseed.jpg>
- 8) <http://web3.wzw.tum.de/oscar/wiki/images/9/90/L.clymenumpod.jpg>

9) http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=piel5_001_ahp.tif

PŘÍLOHY

Textové přílohy

Příloha 1 – Složení média MS (Murashige a Skoog, 1962)

makroelementy	mg/l	mikroelementy	mg/l	vitamíny	mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	H ₃ BO ₃	6,2	thiamin.HCl	0,1
KH ₂ PO ₄	170	MnSO ₄ · H ₂ O	15,6	pyridoxin.HCl	0,5
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	kyselina nikotinová	0,5
NH ₄ NO ₃	1650	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	myo-inozitol	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	glycin	2
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025		
		KI	0,83		
		FeNaEDTA	36,7		

Příloha 2 – Složení roztoku CPW

makroelementy	mg/l	mikroelementy	mg/l
KH ₂ PO ₄	27,2	KI	0,16
KNO ₃	101	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1480		
MnSO ₄ · 7H ₂ O	246		

Příloha 3 – Složení roztoku PGly

makroelementy	mg/l	mikroelementy	mg/l	další složky	g/l
KH ₂ PO ₄	27,2	KI	0,16	glycin	11,15
KNO ₃	101	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	glukóza	18,016
CaCl ₂	1117,6			MES	0,5857
MnSO ₄ · 7H ₂ O	246			mannitol	65,58

Obrazové přílohy

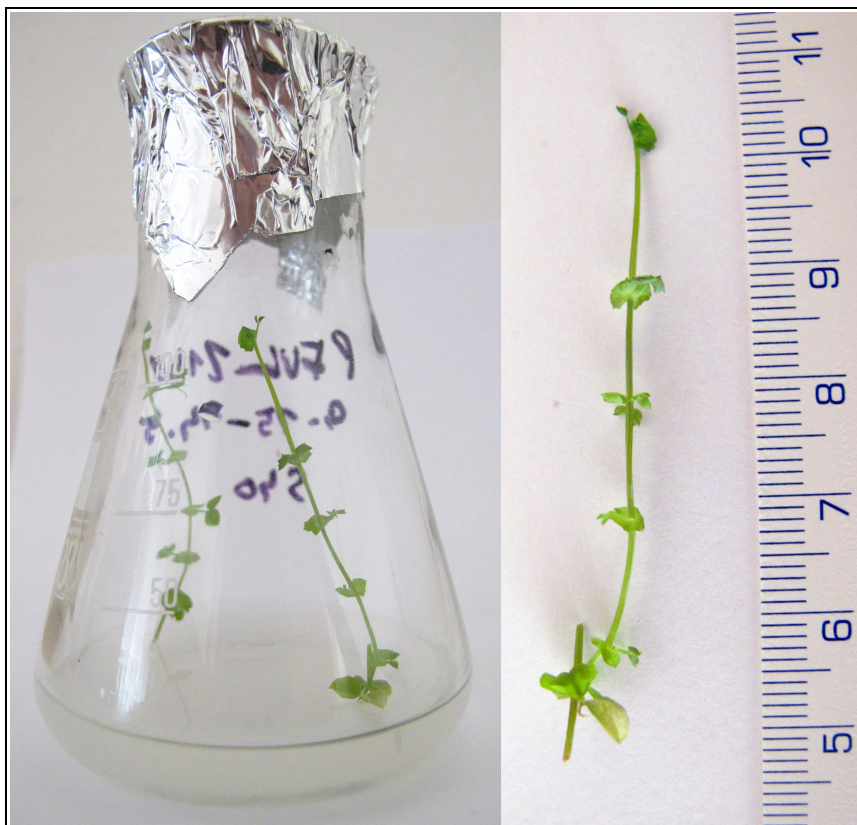
Fot. 1: Klíčící semena *Lathyrus ochrus* ATC81371



Fot. 2: Klíčící semena *Pisum fulvum* WL 2140



Fot. 3: Explantáty *Pisum fulvum* WL 2140 po 4 týdnech kultivace na médiu OK



Fot. 4: Explantáty *Pisum elatius* JI 1794 po 4 týdnech kultivace na médiu OK



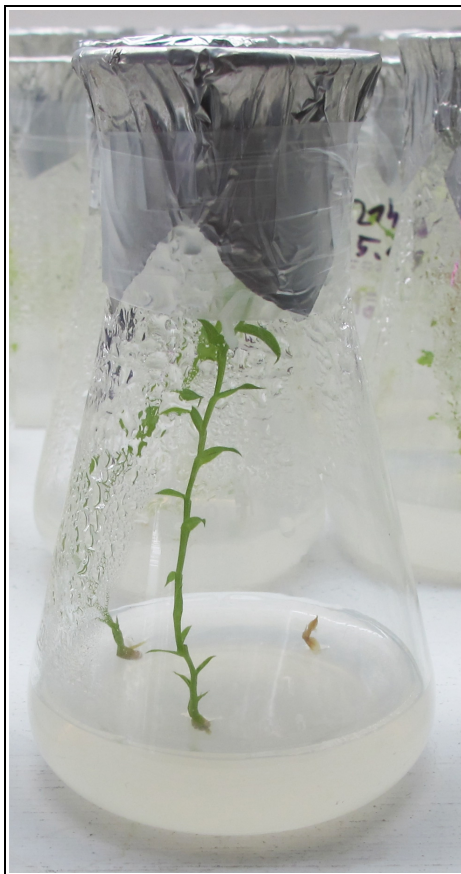
Fot. 5: Explantáty *Lathyrus ochrus* ATC81371 po 4 týdnech kultivace na médiu OK



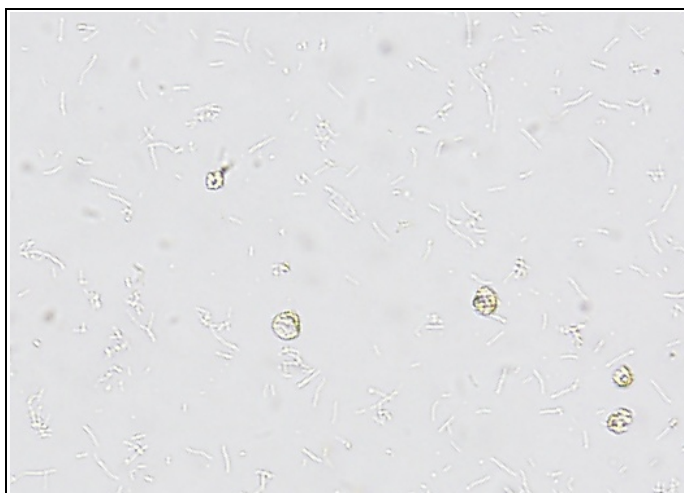
Fot. 6: Explantáty *Pisum elatius* JI 1794 po 4 týdnech kultivace na médiu OKA



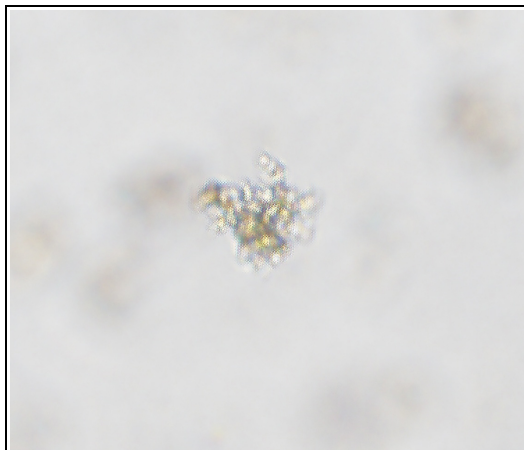
Fot. 7: Explantáty *Lathyrus ochrus* ATC81371 po 4 týdnech kultivace na médiu OKA



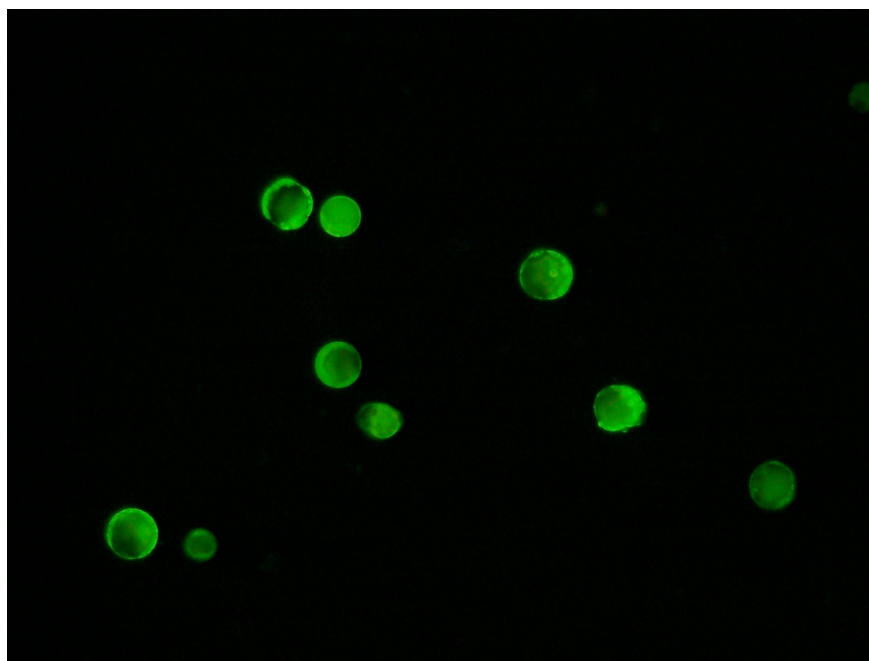
Fot. 8: Bakteriální kontaminace v protoplastové suspenzi



Fot. 9.: Plazmolyzovaná buňka po 8 dnech kultivace v médiu Y



Fot. 10.: Protoplasty *Lathyrus ochrus* ve flourescenčním mikroskopu obarvené pomocí FDA



Autor: RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.