

Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko  
Přírodovědecká fakulta, MU Brno

## **METODIKA 3/08**

### **Metodika pro zjištění postzygotických bariér křížitelnosti u rodu *Trifolium* a získání mezidruhových hybridů**

Jana Řepková  
Barbara Jungmannová  
Martina Soldánová  
Jan Hofbauer

Prosinec 2008

Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o. Troubsko  
Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko  
Přírodovědecká fakulta, MU Brno

ISBN: 978-80-86908-08-3

<b>OBSAH</b>	<b>Str.</b>
<b>I. Cíl metodiky</b>	<b>3</b>
1.1. Rod <i>Trifolium</i> – význam a cíle šlechtění	3
1.2. Mezdruhová hybridizace rodu <i>Trifolium</i>	3
1.3. Charakteristika druhů perspektivních pro mezdruhovou hybridizaci s <i>T. pratense</i>	5
1.4. Embryogeneze	5
1.5. Embryokultury	6
<b>II. Vlastní popis metodiky</b>	<b>7</b>
2.1. Použité roztoky	7
2.2. Křížení	7
2.3. Studium postzygotických bariér	7
2.4. Projasňování pomocí chloralhydrátu	8
2.5. Dopěstování nezralých embryí <i>in vitro</i>	8
2.6. Převedení regenerovaných rostlin do nesterilních podmínek	9
2.7. Množení hybridních rostlin	9
<b>III. Srovnání novosti postupů</b>	<b>9</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b>	<b>9</b>
<b>V. Seznam použité související literatury</b>	<b>10</b>
<b>VI. Seznam publikací které předcházely metodice.</b>	<b>10</b>
Příloha I	11
Dedikace	12
Oponenti	12

## I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je předání možností studia postzygotických bariér křížitelnosti po mezidruhovém křížení v rámci rodu *Trifolium* prostřednictvím studia embryogeneze. To vede k možnosti výběru vhodných komponent pro mezidruhové křížení. Dále metodika přináší postup kultivace nezralých zygotických embryí *in vitro* a postup získání hybridních rostlin. Metodika je určena šlechtitelům, výzkumným pracovníkům a univerzitám.

### 1.1. Rod *Trifolium* – význam a cíle šlechtění

Rod *Trifolium* (jetel) patří do oddělení *Magnoliophyta*, třída *Magnoliatae*, podtřídy *Rosidae*, řádu *Fabales*, čeledě *Fabaceae*. Zahrnuje kolem 300 druhů rostoucích převážně v mírném pásu severní polokoule, vzácněji v západní části Jižní Ameriky a ve východní a jižní Africe.

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) patří vzhledem k vysoké kvalitě píce, vysoké odolnosti proti mrazu a rozšíření k nejvýznamnějším pícninám. Šlechtitelským cílem je vysoká produkce jakostní zelené hmoty a sušiny při respektování vyhovujícího výnosu semene. Výnos hmoty je dán odnožováním, počtem lodyh, větvením, olistěním, výškou rostliny a obsahem sušiny. Důležitou vlastností je mrazuvzdornost, která rozhoduje o přežívání porostů do druhého užitkového roku. Vytrvalost je samostatnou vlastností se značnými výběrovými možnostmi, i když převažuje užitkovost v jednom roce. Žádoucí je i poléhavost ve vlhkých letech. Šlechtitelským cílem je adaptabilita, rezistence k virózám, fuzáriím (*Fusarium* spp.), padlí (*Erysiphe communis*), rakovině (*Sclerotinia trifoliorum*), vytrvalost aj. Heritabilita v užším smyslu je však u jetele lučního jak pro výnos píce, tak i pro vytrvalost nízká (14 – 17%). Rezistence k padlí a ke rzi je dominantní s monogenní dědičností, rezistence k virózám je trojího typu a je kontrolována různými dominantními geny (Chloupek 1995). Odolnost k mšicím má vysokou heritabilitu, odolnost k háďátku zhoubnému (*Ditylenchus dipsaci*) je u jetele lučního kontrolována dvěma dominantními geny.

Šlechtitelské metody zahrnují četné postupy vhodné pro cizosprašné rostliny. Je to kombinační křížení a na něj navazující kmenové šlechtění. Tvorba syntetických odrůd se používá méně, a to pro technicky náročné klonování. Mutační šlechtění nezaznamenává výrazné úspěchy. Z dalších šlechtitelských metod lze použít hromadné selekce, rekurentní selekce podle fenotypu, hodnocení klonů vedoucí k tvorbě syntetických populací. Další metody se používají v případě, že nelze rostliny klonovat nebo nelze tyto klony delší dobu udržet. V rámci rodu se vyskytuje gametofytická inkompatibilita. Polyploidizace jetele lučního vede k formám s vyšší produkcí čerstvé píce, vyšší vytrvalostí, s vyšší odolností k padlí, ale takové formy mají nižší výnos semen (Chloupek 1995). Tetraploidní typy poskytují vyšší výnos zelené hmoty ve srovnání s diploidy, mají však nižší obsah sušiny a nižší obsah dusíkatých látek v sušině. Hlavní nevýhodou je nižší výnos semen. Tetraploidní typy lépe přezimují a dávají jistější výnos hmoty ve druhém užitkovém roce.

### 1.2. Mezidruhová hybridizace rodu *Trifolium*

Jednou z cest jak získat výchozí šlechtitelský materiál požadovaných vlastností je introdukce genů kódujících tyto vlastnosti. To umožňují metody hybridizace, především vzdálené (mezidruhové, popř. mezirodové) hybridizace. Při zlepšování kulturních rostlin je perspektivní využití genofondu planých druhů. U rodů *Trifolium* je mezidruhová hybridizace zaměřena na introdukci genů podmiňujících rezistenci k chorobám, kvalitu a vytrvalost.

Stupeň křížitelnosti druhů a plodnost hybridů jsou závislé jak na systematické a fylogenetické příbuznosti, tak na fyziologické snášenlivosti křížených druhů. Především u

druhů vzdáleně příbuzných se během evoluce vytvořily různé typy bariér, při mezidruhově hybridizaci se do popředí důležitosti dostávají cytologické bariéry a s nimi související bariéry genetické. Lokalizace bariér křížitelnosti je nezbytně nutná při volbě vhodné metody jak tyto bariéry překonat. Příčiny nekřížitelnosti jsou různé; ještě před oplozením se uplatňují prezygotické bariéry, jako je neschopnost cizího pylu klíčit v prostředí cizí blizny, či neschopnost pylové láčky prorůstat čnělkou jiného druhu. Tyto bariéry jsou dány relativní velikostí pylových zrn nebo délkou čnělky. Vlivem postzygotických bariér dochází k aborci embrya v různých fázích jeho vývoje. Nekřížitelnost vyvolávají mechanické, fyziologické a jiné vlivy, například morfologická struktura generativních orgánů, rozdíly v době kvetení, délka a rychlost růstu pylové láčky, fotoperiodická reakce a biochemické rozdíly. Pro překonání prezygotických bariér mezidruhového křížení bylo využito aplikace tzv. „mentor“ pylu (Taylor et al. 1980). Postzygotické bariéry mohou být překonány kultivací nezralých embryí metodami *in vitro* (Philips et al. 1982). Embryokultury byly částečně úspěšné u embryí, které dosáhly raného torpédovitého stadia nebo pozdější fáze vývoje před exstirpací. V generaci F<sub>1</sub> jsou problémy s výskytem chloróz, neobvyklým růstem kořene, sterilitou a špatným růstem. U mezidruhových hybridů může buď docházet k tvorbě fertálních semen, nebo se u rostlin vyskytuje úplná sterilita bez tvorby semen, či dojde k oplození, ale embryo během vývoje abortuje (Keim 1953). Největší roli hrají cytologické a genetické bariéry vyplývající z různého počtu a nízké homologie chromozomů křížených druhů.

Z historického hlediska možnou metodou pro překonání prezygotických bariér bylo opylení *in vitro*. Uhynutí rostlin v prvních fázích jejich ontogenetického vývoje ještě před kvetením lze obejít metodou regenerace rostlin *in vitro*. Teoretické i praktické možnosti při vzdálené hybridizaci nabízí metoda enzymatické izolace protoplastů, jejich fúze (somatická hybridizace) a následná regenerace v rostliny. Tato metoda umožňuje nejen přenos genomu jaderného, ale i chloroplastového a mitochondriálního. Je možné křížení vzdálených druhů a využití nových genových zdrojů.

Pro mezidruhovou hybridizaci v rámci rodu *Trifolium* jsou perspektivní druhy 1. sekce *Lotoidea*. Sem patří jetel plazivý (*T. repens* L.), což je druh intenzivně zemědělsky využívaný pro pastevní směsi a technická zatrávňení, tvoří nadzemní výhony, kterými se v porostu rozšiřuje. Je to tetraploid ( $2n = 32$ ) se základním chromozomovým číslem  $x = 8$  (Morris and Greene 2001). Odolnost vůči chorobám, zvláště virózám, a vymrzání, je značně nízká. Perspektivní je jeho křížení s *T. ambiguum* M.Bieb., vytrvalým druhem, vegetativně se udržujícím krátkými podzemními výběžky. Má vysokou odolnost vůči biotickým a abiotickým faktorům. Jde o druh velmi perspektivní vzhledem ke své rezistenci k viru žluté mozaiky fazolu, viru žluté žilkovitosti jetele a viru vrcholové nekrózy hrachu. Druh má diploidní i tetraploidní odrůdy. *T. repens* byl např. úspěšně křížen s *T. ambiguum* (Williams and Verry 1981), *T. uniflorum* (Pandey et al. 1987), *T. occidentale* a *T. nigrescens*. Do skupiny druhů příbuzných s *T. repens* zařadil Cleveland (1985) *T. nigrescens*, *T. occidentale* a *T. uniflorum*. Jejich křížení je úspěšné na úrovni stejné ploidie; *T. repens*, *T. occidentale* a *T. nigrescens* mají společný základní genom. Další příbuzný druh *T. ambiguum* má s *T. repens* částečně homologní sady chromozomů.

Do 6. sekce *Trifolium* patří jetel luční (*T. pratense* L.), také druh intenzivně zemědělsky využívaný. Jeho odolnost vůči chorobám a vymrzání je značně nízká. Vhodným donorem genů podmiňujících rezistenci k virovým chorobám je *T. alpestre* L., *T. medium* a *T. sarosiense* Hazsl. Na základě sledování bariér křížitelnosti u 10 mezidruhových kombinací, včetně reciprokých, byla u rodu *Trifolium* vytipována perspektivní kombinace křížení pro *T. pratense* (Řepková et al. 2006). Je křížitelný s druhy *T. diffusum* a *T. pallium*. *T. sarosiense* je považován za geneticky samostatný druh (Quesenberry and Taylor 1977).

### 1.3. Charakteristika druhů perspektivních pro mezidruhovou hybridizaci s *T. pratense*

#### *Trifolium pratense* L. – jetel luční

Druh mimořádně proměnlivý ve vzrůstu, velikosti a v odění lodyh a palistů podpůrných listů. V některých pohořích střední a jižní Evropy a na mořských pobřežích tvoří morfologicky diferencované rasy, hodnocené jako poddruhy a variety.

Je rozšířen téměř po celé Evropě, na severu po 70° s.š., na východě zasahuje do Asie po Altaj, Bajkal a severní Indii. Zavlečený, zdomácnělý a pěstovaný ve východní Asii, Severní a Jižní Americe, Austrálii, Novém Zélandu a v jižní Africe. Výhradně cizosprašná rostlina opylovaná především čmeláky, ale také včelami.

#### *Trifolium medium* L. – jetel prostřední

Vyskytuje se na křovinatých i travnatých stráních, mezích, ve světlých lesích, loukách a pastvinách, tvoří lesní lemy. Optimum výskytu je na mírně suchých až čerstvě vlhkých, částečně zastíněných místech, a to jak na kyselých, tak i na bazických substrátech. V České republice je rozšířen dosti hojně od nižších pahorkatin do hor. Vzácně nebo místy chybí v nejteplejších a nejsušších oblastech (např. Lounsko, Pavlovské vrchy, Terežinská kotlina) a v horách nad 800 m. Další výskyt je v Evropě na severu přibližně po 64°, na východě po Ural, Kavkaz a jižní pobřeží Kaspického moře.

Jde o perspektivní pícninu. Dosavadní výzkumy ukazují, že je ve srovnání s *T. pratense* odolnější proti poškození podzemních částí těžkou mechanizací, proti padlí *Erysiphe polygoni*, a je mimořádně rezistentní k virovým chorobám (Smrž et al. 1985).

### 1.4. Embryogeneze

Při generativním rozmnožování vzniká celý organizmus z jediné buňky – zygoty. U semenných rostlin se z ní vytvoří nejprve zárodek, čili embryo. V diferencovaném embryu lze pozorovat základy všech budoucích pletiv a orgánů dospělé rostliny. Mezi dělohami se nachází vzrostný vrchol budoucího prýtu. Na opačném konci embrya se nachází radikula, základ budoucího kořene. Mezi radikulou a dělohami se nachází hypokotyl. Vnější diferenciací embrya odráží diferenciaci na buněčné úrovni. Základ kořene a prýtu je tvořen nevakuolizovanými buňkami. Při dalším vývoji se tyto oblasti přeměňují na apikální meristémy kořene a prýtu. Buňky na povrchu embrya tvoří souvislou vrstvu označovanou jako protoderm a při dalším vývoji embrya se z nich diferencuje krycí pletivo epidermis. Protáhlejší buňky ve středu hypokotyly označovaném jako prokambium se diferencují ve vodivá pletiva. Mezi prokambiem a protodermem se nacházejí více vakuolizované buňky tzv. základního meristému, které se při klíčení embrya mění v pletivo základní. Při klíčení se buňky embrya intenzivně dělí a embryo se postupně přeměňuje na dospělou rostlinu.

U *T. pratense* je zygota lokalizována na mikropylárním konci zárodečného vaku a sousedí s centrální buňkou cytoplazmy. První patrnou změnou v zárodečném vaku během oplození je degenerace synergid. K prvnímu dělení zygoty dochází v příčném nebo šikmém směru. Výsledkem jsou dvě nestejně dceřinné buňky proembrya. Bazální buňka je větší než terminální. Ontogeneze embrya je klasifikována typem Onograd, varieta *Trifolium* (Mackiewicz 1965). Čtyřbuněčné proembryo obsahuje několik malých vakuol. Terminální buňka se prodlužuje. Jádru zabírá větší část buňky a obsahuje jádérko s několika malými vakuolami. Proembryonální buněčná stěna je velmi tenká bez patrné střední lamely.

Během rané fáze růstu globulárního embrya narůstá počet vakuol a zmenšuje se jejich velikost. Endosperm obsahuje četná jádra a obklopuje embryo. Vlivem kontinuálních

mitotických dělení roste počet buněk globulárního embrya. Začíná tkáňová diferenciace, vytváří se vnější vrstva buněk, protoderm. Buňky embrya obsahují v cytoplazmě hojné organely a početné malé i několik velkých vakuol. Před iniciací děloh se přes povrch embrya formuje kutikula, ta chybí v oblasti suspensoru. Endosperm se začíná utvářet na mikropylárním konci zárodečného vaku, rozšiřuje se k chalazálnímu konci a nějakou dobu zůstává ve volné jaderné formě. Jádra endospermu jsou variabilní jak ve velikosti, tak ve tvaru. Cytoplazma endospermu obsahuje početné organely, jedno či dvě jádra; vykazuje značnou metabolickou aktivitu (Algan and Bakar 1996). Během pozdní globulární fáze začíná diferenciace buněčného endospermu. Probíhá od mikropylárního konce k chalazálnímu.

Suspensor raného globulárního stadia se skládá ze čtyř nebo šesti buněk. Svým růstem tyto buňky zatlačují embryo hlouběji do zárodečného vaku. V dalším vývoji se suspensor skládá z několika vakuolizovaných buněk a obsahuje bazální a hypofyzární buňku. Ve společných buněčných stěnách mezi suspensorem a embryem se vyskytují plazmodezmata. Během srdčitého stadia se suspensor zvětšuje, začíná degenerovat a rozkládá se většina organel.

Pokračující buněčné dělení v apikální části embrya vede ke zvětšování jeho velikosti k další diferenciaci na srdčité embryo. Projevuje se výrazná bilaterální symetrie, začínají se utvářet primordia děloh. V pozdní srdčité fázi se diferencuje apikální a kořenový systém. Dvě dělohy zabírají mikropylární polovinu zárodečného vaku. Buňky děloh začínají shromažďovat škrob a proteiny. Raný buněčný endosperm je značně vakuolizovaný a má tenké stěny. Cytoplazma obsahuje četné plastidy. Drsné endoplazmatické retikulum je v uzavřených rovnoběžkách a je spojeno se stěnou a cytoplazmatickou membránou buněk.

Dalším stadiem vývoje je torpédovité embryo. V tomto stadiu dochází k prodlužování embryonální osy a celkovému zvětšení embrya. Centrální buňka hypokotylu a radikuly tvoří primární cévní tkáň. Stěny endospermu jsou připojeny k embryu. Cytoplazma embryonálních buněk obsahuje četné ribozomy, mitochondrie, plastidy, počet vakuol a diktyozomů je omezen. Některé z plastidů mají škrobová zrna. Ve všech buňkách jsou přítomna proteinová tělíska.

## 1.5. Embryokultury

Kultivace zralých i nezralých zygotických embryí odděleně od pletiv semene ve sterilním prostředí a iniciace jejich růstu až po celistvou rostlinu, byla jednou z prvních metod explantátových kultur u rostlin. Zdokonalování technických podmínek kultivace a získání řady nových poznatků o vlastnostech prostředí, ve kterém se embryo vyvíjí *in situ*, umožnilo spolehlivěji kultivovat embrya ve stále mladší vývojové fázi.

Pro úspěšnou kultivaci embryí *in vitro* je nejdůležitější optimalizace kultivačního média, které stimuluje úspěšný vývoj embryí exstirpovaných v různých vývojových fázích. Kultivační médium musí poskytovat ve vhodné formě zdroj uhlíku, dusíku aj. makroelementů a další stimulační látky. Pro nezralá embrya rodu *Trifolium* bylo modifikováno speciální médium. Hlavním zdrojem energie embryí kultivovaných *in vitro* jsou glycidy. Nejvhodnějším a nejpoužívanějším je sacharóza. Vhodná koncentrace sacharózy je ovlivněna rostlinným druhem, ale především vývojovým stupněm exstirpovaného embrya. Sacharóza není jen zdrojem energie, ovlivňuje i osmotickou hodnotu kultivačních médií. Také v podmínkách *in situ* jsou embrya obklopena roztokem o vysoké osmotické hodnotě. Vysoká koncentrace sacharózy zabraňuje předčasnému klíčení nezralých embryí, což má za následek vznik různých morfologických anomálií regenerovaných rostlin.

Vitamíny jako nositelé prostetické skupiny některých enzymů se používají jako složka médií především při kultivaci velmi mladých embryí. Jejich přítomnost však není vždy nezbytná. Pokud je přítomnost vitamínů žádoucí, používá se nejčastěji thyamin, pyridoxin,

kyselina nikotinová, pantotenová, askorbová a biotin. Například nejčastěji používaný glutamin stimuluje růst embryí zástupců devíti čeledí. Byl využit při dopěstování nezralých hybridních embryí rodu *Medicago*.

Vliv růstových látek na vývoj embryí *in vitro* je závislý nejen na jejich druhu a použité koncentraci, ale především na jejich vzájemném poměru v médiu, na rostlinném druhu a stupni diferenciaci embrya. Při vystižení optimální koncentrace působí příznivě na vývoj embryí *in vitro*. Pro kultivaci jetelů v nejmladší vývojové fázi se nejlépe osvědčilo dodání kyseliny gibberelové nebo adeninu v kombinaci s picloramem do média. Růstové látky mají pozitivní vliv na přežívání i rychlost růstu embryí, což se projevuje prodlužováním radikulární části.

Úspěšné přežívání nezralých embryí v podmínkách *in vitro* se zvětšuje s jeho velikostí. Je to ovlivněno především zlepšením metodiky jejich kultivace včetně složení médií. Dopěstování menších, především globulárních embryí, je spojeno s potížemi. Specifičnost požadavků na prekuzory, které mu poskytuje endosperm, klesá s postupnou diferenciací embrya. Buduje se jeho kompletní enzymatický aparát, embryo se stává soběstačné nejen v syntéze nukleových kyselin a bílkovin, ale i vitamínů a růstových látek. V pozdní globulární a rané srdčité fázi dochází k významnému mezníku ve vývoji embrya. Mění se pravděpodobně způsob příjmu živin jeho buňkami. Embryo přechází z převážně suspenzorové výživy na výživu povrchovou, kdy hlavním zdrojem výživných a regulačních látek je endosperm. Jeho výživná funkce může být nahrazena kultivačním médiem.

## II. Vlastní popis metodiky

### 2.1. Použité roztoky

Fixační směs: FAA – formaldehyd : kyselina octová : etylalkohol (5 : 5 : 90).

Nasycený roztok chloralhydrátu: 8 g chloralhydrátu rozpustit přes noc při laboratorní teplotě ve 3 ml destilované vody, přidat jednu až dvě kapky glycerolu. Uchovávat v ledničce při 4 °C. Kultivační médium : Příloha I.

### 2.2. Křížení

Rostliny jsou vypěstovány ze semen ve skleníkových podmínkách. Kvetení je dosaženo při fotoperiodě 16 hodin. U všech mezidruhových křížení je nezbytné ruční opylování s kastrací – odstranění celých tyčinek nebo prašníků před prasknutím prašných váčků. Květy jsou kastrovány pomocí kastrovací pinzety jeden den před nanášením pylu na bliznu, tedy vlastním křížením. Květy s odstraněnými tyčinkami jsou označeny tuší a rostliny štítkem s popisem kombinace křížení. Po 24 hodinách je nanášen pyl z rostliny příslušného genotypu na bliznu pomocí preparační jehly. Opylení je možné opakovat druhý den. Květenství je nutné izolovat před nežádoucím pylem monofilovými sítěmi. Rostliny s nakříženými květy jsou umístěny v kultivační místnosti, klimatizované komoře s kontrolovanými podmínkami nebo ve skleníku. Optimální podmínky jsou fotoperioda 16 hodin, teplota 25 °C ve dne a 16 °C v noci, intenzita osvětlení 20 000 Lux a vlhkost 55% ve dne a 70% v noci. Nakřížené květy k dalšímu zpracování jsou odebírány v časovém intervalu osm dní po ručním opylení.

### Vhodné kombinace křížení

Mateřská rostlina *T. pratense* 2n = 4x; otcovská rostlina jako zdroj pylu *T. medium*.

### 2.3. Studium postzygotických bariér



Pro sledování bariér ve vývoji endospermu a embrya byla zvolena metoda projasňování rostlinných pletiv. Projasňovací médium projasňuje fyzikálně tím, že sjednocuje index lomu všech buněčných komponent a okolí. Buněčný obsah zůstává zachován, k jeho další diferenciaci slouží barvení. Preparáty můžeme prohlížet při šikmém osvětlení, v procházejícím světle nebo ve fázovém kontrastu. Před působením projasňovacího média je materiál fixován. Fixací se rozumí rychlé vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a pletiv fixačními prostředky, které mají zabránit samovolnému rozkladu živých pletiv – autolýze. Preparáty jsou pozorovány pomocí Nomarského optiky. Tato optika využívá interferenci světla (DIC, differential interference contrast) k rozlišení nebarvených preparátů na základě povrchových struktur a počtu struktur a počtu vrstev buněk nad sebou.

#### 2.4. Projasňování pomocí chloralhydrátu

Pod preparačním mikroskopem se odstraní kališní a korunní lístky z květů odebraných osm dní po ručním opylení. Z takto upravených květů zbudou pestíky, které se umístí v mikroskopu se 300  $\mu$ l fixační směsi (kap. 5.1.). Fixace probíhá při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby se odsaje fixační roztok a materiál je zavodněn v etanolové řadě o koncentracích 96%, 70% a 30%. V každé koncentraci je promývání prováděno třikrát. Následuje třikrát promytí v destilované vodě. Objekty se pomocí preparační jehly přenesou na podložní sklíčko s kapkou chloralhydrátu (kap. 5.1.) a odpreparují se obalové stěny semeníku. Takto připravené preparáty jsou přikryty krycím sklíčkem. Chloralhydrát se nechá působit přes noc při laboratorní teplotě nebo při 4 °C. preparáty jsou vyhodnoceny následující den světelným mikroskopem s Nomarského optikou, při zvětšení 100x.

Pomocí této metody se ověří schopnost zygotických embryí vyvíjet se do fáze torpéda. Postup tak umožňuje výběr vhodné kombinace křížení.

#### 2.5. Dopěstování zygotických embryí *in vitro*

##### *Preparace embryí*

Květy s vyvíjejícími se semeníky jsou odebrány v časovém intervalu osm dní po opylení a povrchově sterilizovány 3 min v 70% etanolu a 15 min v Savu (vodný roztok 1:1) s následným trojnásobným promýváním ve sterilní destilované vodě. Ve sterilních podmínkách ve flowboxu jsou preparována životaschopná embrya ve stadiu torpéda. Preparace se provádí pomocí stereomikroskopu při zvětšení 40x.

##### *Kultivační médium*

Pro přímou kultivaci zygotických embryí se používá základní médium L2 (Philips and Collins 1979; Příloha I). Pro kultivaci jetelů v torpédovité fázi je v tomto médiu zvýšena koncentrace sacharózy na 7,5 až 10,0%. Embrya v srdčité fázi vyžadují 12,5% sacharózu. Největší podíl dopěstovaných zralých embryí je zaznamenán na médiu s 2,5% sacharózou (Řepková et al. 1991; Řepková 1992).

Pro kultivaci embryí v srdčité fázi se nejlépe osvědčilo dodání 0,1  $\mu$ M GA<sub>3</sub> do média s 12,5% sacharózou (Řepková 1992). Pro embrya v této vývojové fázi je také vhodné dodání 15 M adeninu v kombinaci s 0,03  $\mu$ M picloramu (Philips et al. 1982; Řepková et al. 1991). Růstové látky mají pozitivní vliv na přežívání a rychlost růstu embryí, což se projevuje prodloužením radikulární části embrya. Za 10 dní kultivace na těchto médiích jsou embrya pasážována na médium pro embrya v torpédovité fázi (Řepková 1992).

Pro embrya v torpédovité fázi je vhodné dodání 15 M adeninu do média s 7,5% sacharózou. Podíl přežívajících embryí je na tomto médiu vyšší (Řepková 1992).

### *Kultivace embryí*

Kultury jsou umístěny v kultivační místnosti při fotoperiodě 16 hodin a teplotě 25 °C. Během dorůstání embryí z torpédovité popř. srdčité fáze do zralosti je nezbytné jejich přenášení na média optimální pro dané stadium. Zralá embrya jsou kultivována na bazálním médiu L2 s 2,5% sacharózou.

### *2.6. Převedení regenerovaných rostlin do nesterilních podmínek*

Na bazálním médiu L2 embrya prorůstají v rostliny. Pokud rostliny nemají dostatečný kořenový systém, jsou přenášeny na bazální tekuté médium L2 (Příloha I). Rostliny s vyvinutým kořenovým systémem lze převádět do nesterilních podmínek. Nejdříve do perlitu nasyceném tekutým médiem L2 o poloviční koncentraci. Rostliny jsou uchovávány v plastových skleničkách z důvodu udržení co nejvyšší vlhkosti. Po adaptaci rostlin na tyto podmínky můžeme pomalu odvětrávat v prodlužujících se intervalech. Kontrolujeme zavádění rostlin. Při vadnutí víko skleničku zavřeme.

### *2.7. Množení hybridních rostlin*

Pro klonové množení hybridních a rodičovských rostlin je aplikována metoda regenerace rostlin z vrcholových a úžlabních pupenů. Pupy jsou kultivovány na základním médiu L2 doplněném o následující růstové látky:

2 μM Adeninu + 0,1 μM Benzylaminopurinu + 0,05 μM Naftyloctové kyseliny

Kořenění je dosaženo na tekutém médiu L2.

## **III. Srovnání novosti postupů**

Postupy uvedené v metodice jsou originální a nelze je jako celek porovnávat s žádnou metodikou, poněvadž žádná podobná metodika nebyla vydána. Jedná se o propojení vlastních dílčích výsledků základního a aplikovaného výzkumu pro využití ve šlechtitelské praxi.

- 1) Základním výzkumem je optimalizace postupu projasňování rostlinných pletiv chloralhydrátem s cílem studia embryogeneze u jakéhokoliv druhu a metoda embryokultur s cílem dopěstování rostlin v podmínkách *in vitro*.
- 2) Aplikovaný výzkum představuje aplikace těchto metod u konkrétního druhu s cílem studia postzygotických bariér křížitelnosti a dopěstování nezralých zygotických embryí v hybridní rostliny.
- 3) Přímou aplikaci ve šlechtění pak naleznou hybridní rostliny jako výchozí šlechtitelský materiál s novými vlastnosti.

## **IV. Popis uplatnění metodiky**

Metodika „ Studium postzygotických bariér křížitelnosti u rodu *Trifolium* a získání mezidruhových hybridů“ bude využita šlechtiteli na šlechtitelských stanicích pro získávání mezidruhových hybridů u jetelů. Jedná se o šlechtitelské stanice zabývající se šlechtěním jetelovin jako např. firma Agrogen,s.r.o Troubsko- ŠS Slavice, ŠS Želešice, firma Tagro,s.r.o. Červený Dvůr, ŠS Hladké Životice, OSEVA UNI, a.s. Choceň-ŠS Domoradice, ŠS Větrov.

## V. Seznam použité související literatury

- Algan G, Bakar HN (1996) Light and electron microscopic examination of the embryo and endosperm development in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Isr J Plant Sci* 44: 273-288
- Cleveland RW (1985) Reproductive cycle and cytogenetics. In: Taylor NL (ed.) *Clover Science and Technology* no. 25. Amer Soc Agron Publ, Madison
- Chloupek O (1995) Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia, Praha
- Keim WE (1953) Interspecific hybridization in *Trifolium* using embryo culture techniques. *Argon J* 45: 6509-510, 601-606
- Mackiewicz T (1965) Low seed-setting in tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.) in the light of cytoembryological analysis. *Genet Pol* 6: 5-39
- Morris JB, Greene SL (2001) Defining a multiple-use germplasm collection for the genus *Trifolium*. *Crop Sci* 41: 893-901
- Pandey KK, Grant JE, Williams EG (1987) Interspecific hybridization between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Austral J Bot* 35: 171-182
- Philips GC, Collins GB, Taylor NT (1982) Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosiense* Hazsl. using *in vitro* embryo rescue. *Theor Appl Genet* 62: 17-24
- Quesenberry KH, Taylor NL (1977) Interspecific hybridization in *Trifolium* L., section *Trifolium* Zoh. II. Fertile polyploid hybrids between *T. medium* L. and *T. sarosiense* Hazsl. *Crop Sci* 17: 141-145
- Smrž J, Musil M, Vacek V (1985) Náchylnost vybraných druhů z čeledi *Viciaceae* k virózám. In: Sbor věd prací VŠÚP Troubsko 9: 163-170
- Taylor NL, Quale RF, Anderson MK (1980) Methods of overcoming interspecific barriers in *Trifolium*. *Euphytica* 29: 441-450
- Williams E, Verry IM (1981) A partially fertile hybrid between *Trifolium repens* and *T. ambiguum*. *N Z J Bot* 14: 1-7

## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice.

Řazeno chronologicky:

- Řepková J, Nedbálková B, Holub J (1991) Regeneration of plants from zygotic embryos after interspecific hybridization within the genus *Trifolium* and electrophoretic evaluation of hybrids. In: *Sci Stud Res Inst Fodder Plants Troubsko* 12: 7-13
- Řepková J (1992) Vývoj embrya a kultury embryí rodu *Trifolium*. Kandidátská disertace. Praha, ÚEB AV
- Kyjojská Z, Řepková J, Relichová J (2003) New embryo lethals in *Arabidopsis thaliana*: basic genetic and morphological study. *Genetica* 119(3), 317-325
- Kocábek T, Řepková J, Dudová M, Hoyerová K, Vrba L (2006) Isolation and characterization of a novel semi-lethal *Arabidopsis thaliana* mutant of gene for pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein. *Genetica* 128: 395-407
- Řepková J, Jungmannová, B, Jakešová, H (2006) Identification of barriers to interspecific crosses in the genus *Trifolium*. *Euphytica* 151: 39- 48

## Příloha I

Základní kultivační médium L2 pro kultivaci zygotických embryí *Trifolium in vitro*

	Regenerační (mg/l)	Kořenící (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 000	500
KNO <sub>3</sub>	2 100	1 050
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	325	162,5
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	85	42,5
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	600	300
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	435	217,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,0	2,5
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	15	7,5
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5,0	2,5
KI	1,0	0,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,4	0,2
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,1	0,05
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1	0,05
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	37,3	37,3
Thiamin (B <sub>1</sub> )	2,0	2,0
Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	0,5	0,5
m-inositol	250	-
sacharóza	25 000	10 000
agar	8000	-

**Dedikace:** MZe ČR NAZV č. **1G46034**, MŠMT ČR č. **MSM0021622415** a **MSM 2629608001**

**Vydává:** Výzkumný ústav pícninářský, s.r.o. a Zemědělský výzkum, s.r.o. Troubsko

**Návrh oponentů**

**Oponenti:** 1) RNDr.Věra Mrázková, CSc. UKZUZ Brno, státní správa  
2) Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., MZLU v Brně, Agronomická fakulta, odborník z oboru.

**Autoři:**

Doc.RNDr.Jana Řepková,CSc. ,MU, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Brno

Mgr.Barbara Jungmannová, Výzkumný ústav pícninářský, s.r.o., Troubsko

Ing.Martina Soldánová, MU, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie Brno

RNDr.Jan Hofbauer,CSc., Výzkumný ústav pícninářský, s.r.o., Troubsko