



Přírodovědecká
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

Metodika *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.)

Božena Navrátilová
Michaela Švécarová
Vladan Ondřej

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky

Metodika *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.)

Božena Navrátilová
Michaela Švécarová
Vladan Ondřej

Olomouc
2018

Oponenti:

Ing. Markéta Altová
Ministerstvo zemědělství ČR, Praha
Odbor rostlinných komodit

Ing. Petr Svoboda, CSc.
Chmelařský institut s. r. o., Žatec
Oddělení biotechnologie

Publikace je součástí výstupu v rámci projektu MZe č. NAZV QJ1510160
„Nové technologie získávání aktivních látek z léčivých a aromatických rostlin
jako zdrojů účinných látek botanických pesticidů a potravinových doplňků“.
Online verze metodiky je veřejně přístupná na adrese: www.botany.upol.cz/vyzkum/.

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat
občanskoprávní, správní, popř. trestněprávní odpovědnost.

1. vydání

© Božena Navrátilová, Michaela Švécarová, Vladan Ondřej, 2018
© Univerzita Palackého v Olomouci, 2018

ISBN 978-80-244-5389-7 (print)
ISBN 978-80-244-5390-3 (online : PDF)

Motto:

*„Myslíme jenom nato, že chmel je naše zlato. Jediné co nám svato,
je chmel a jenom chmel.“*

Starci na chmelu

Obsah

1	Cíl metodiky	6
2	Úvod	6
3	Vlastní popis metodiky.....	7
3.1	Rostlinný materiál.....	7
3.2	Přístrojové vybavení	7
3.3	Chemikálie	7
3.4	Spotřební materiál.....	7
3.5	Sterilizace skla, nástrojů a pomůcek.....	8
3.6	Příprava kultivačních médií	8
3.7	Sterilizace kultivačních médií.....	9
3.8	Příprava zásobního a pracovního roztoku oryzalinu.....	9
4	Postup ovlivnění rostlinného materiálu oryzalinem.....	10
4.1	Mikropropagace donorového rostlinného materiálu.....	10
4.2	Ovlivnění oryzalinem.....	10
4.3	Kultivace ovlivněného materiálu a regenerace rostlin.....	11
4.4	Mikropropagace polyploidních rostlin.....	11
4.5	Převod polyploidních rostlin do nesterilních podmínek	12
4.6	Hodnocení rostlin.....	12
4.6.1	Flowcytometrie	12
4.6.2	Počítání chromozomů z kořenových špiček.....	13
4.6.3	Stanovení ploidie podle velikosti průduchů (stomat).....	13
5	Srovnání novosti postupů	14
6	Popis uplatnění metodiky	14
7	Ekonomické aspekty.....	15
8	Dedikace	15
9	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	15
10	Seznam použité literatury	16
	Přílohy.....	17

1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je postup vedoucí ke zvýšení ploidie u chmele aplikací oryzalinu jako polyploidizačního agens v podmínkách *in vitro* a to metodou kultivace prýtočných segmentů na médiu s obsahem oryzalinu. Postup metodiky umožňuje získat rostliny chmele s novými vlastnostmi, např. s vyšším obsahem cílených sekundárních metabolitů a s jejich následnou mikropropagací k získání nových klonů a jejich převod do nesterilních podmínek.

2 Úvod

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je kulturní rostlina, která je na území České republiky pěstovaná pro domácí výrobu nebo na export. V kultuře jsou pěstovány samičí rostliny pro své chmelové šišťice (hlávky, *Strobili lupuli*), s obsahem sekundárních metabolitů (Maliar a kol. 2017). Hlavní využití chmele je v pivovarnickém průmyslu, ale i v průmyslu farmaceutickém a potravinářském.

Šlechtění chmele má v České republice dlouholetou tradici, je především zaměřeno na aromatické a hořké chmele. Pro šlechtitele jsou základem genetické zdroje a perspektivní genotypy musí vykazovat odolnost k houbovým chorobám, dobré agrotechnické parametry, na nízké konstrukce a dobré pivovarské vlastnosti (Nesvadba a kol. 2012, Nesvadba a kol. 2017).

Výhodou polyploidie je zvýšení genetické variability rostlin, může docházet i k pozitivním strukturálním změnám rostlinných buněk, polyploidní rostliny mají větší buňky, vyšší obsah chlorofylu (intenzivnější fotosyntéza) a často se zvyšuje i obsah některých látek (Trojak-Goluch a Skomra 2013). Oryzalin je dinitroanilinový herbicid s antimikrotubulárními účinky a je vhodný pro indukci polyploidie, protože je aplikován v nižších koncentracích než např. kolchicin, zároveň je pro člověka, rostlinu a životní prostředí méně toxický (Tosca a kol. 1995).

3 Vlastní popis metodiky

Metodika zahrnuje následné kroky:

1. přípravu dostatečného množství výchozího rostlinného materiálu *in vitro*,
2. použití segmentů z prýtů s úžlabními pupeny k ovlivnění oryzalinem,
3. zisk rostlin a hodnocení ploidie.

3.1 Rostlinný materiál

Výchozí materiál pro metodiku pochází z Chmelařského institutu s. r. o., Žatec. Předané rostlinky byly pěstovány ve skleněných zkumavkách na pevném médiu Murashige a Skoog (1962): cv. Sládek a Osvaldův klon č. 31, 72 a 114. Tyto genotypy byly následně při pasážích segmentovány a množeny s cílem získat dostatečný počet rostlin pro experimenty *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu.

3.2 Přístrojové vybavení

Laminární box, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, termostat, flowcytometr, mikroskop Olympus BX 60, analytické váhy, pH-metr, míchačka, chladnička, mikrovlnná trouba, mikropipeta.

3.3 Chemikálie

Kultivační médium Murashige a Skoog 1962 (makro-, mikroelementy, vitamíny, Duchefa), sacharóza (p.a.), kyselina askorbová, kyselina indolyl-3-máselná (IBA), 6-benzylaminopurin (BAP), agar (Duchefa), oryzalin (Sigma), dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma).

3.4 Spotřební materiál

Sterilní chirurgické nástroje (dlouhé pinzety a skalpely), chirurgické rukavice, láhve se šroubovacím uzávěrem (objem 50, 250 a 500 ml), Erlenmeyerovy baňky (100 ml), sterilní serologické pipety 2 ml, špičky pro mikropipety, alobal, buničitá vata, plastové Petriho misky, zkumavky*, stojánky na zkumavky, filtrační papír, uzavíratelná nádoba na nebezpečný

odpad při práci s oryzalinem, lihový kahan, potravinářská fólie, rašelinové tablety (Jiffy průměr 44 / výška 7 mm, Rosteto), minipařeniště.

*Pozn. * Doporučení: sterilní plastové zkumavky „De Witt“ (Duchefa), které jsou širší a šetrnější při manipulaci s rostlinným materiálem.*

3.5 Sterilizace skla, nástrojů a pomůcek

Sklo, filtrační papír a nástroje potřebné pro aseptickou práci, zabalíme do alobalu, sterilizačních sáčků nebo nástroje vložíme do nerezových boxů a sterilizujeme při 180 °C po dobu 30 min v horkovzdušném sterilizátoru (sušárně s uzavřeným okruhem).

Při práci ve flowboxu nástroje opakovaně sterilizujeme ponořením do 96% etanolu a následně opálením nad plamenem kahanu.

Pozn. Potřebné plasty jsou již sterilizovány výrobcem.

3.6 Příprava kultivačních médií

Při přípravě kultivačních médií používáme čisté sklo, destilovanou vodu, vhodné chemikálie (p.a.) a jejich přesné navážky. Složení médií je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1: Složení kultivačních médií

	MS	MSR	MSM
	množství mg/l		
MS medium (Duchefa)	4 405	4 405	4 405
sacharóza	30 000	30 000	30 000
agar (Duchefa)	8 000	8 000	8 000
kyselina askorbová	–	20	4
IBA	–	0,01	0,1
BAP	–	0,01	0,1
pH	5,8	5,8	5,8

Vysvětlivka: MSR – regenerační a kultivační médium, MSM – médium pro mikro-propagaci.

Pozn. Používáme nízké koncentrace růstových regulátorů, abychom zamezili tvorbě kalusu a shluku drobných vitrifikovaných prýtlů vznikajících na bázi.

Navážku média MS a sacharózy rozpustíme v kádince (objem 1 000 ml) na míchačce v cca 400 ml destilované vody. Agar vsypeme do 500 ml destilované vody v plastové kádince (objem 1 000 ml) a rozvaříme v mikrovlnné troubě (cca 5 min). Oba objemy smícháme, doplníme destilovanou vodou do 1 000 ml objemu a upravíme pH na 5,8. Pokud přidáváme do média růstové regulátory ze zásobních roztoků, použijeme sterilní serologické plastové pipety a pipetovací nástavec.

Připravené médium rozlijeme do lahví s uzávěrem (objem láhve 500 ml – objem média 300 ml, objem láhve 250 ml – objem média 100 ml), které uzavřeme a sterilizujeme autoklávováním. Lahve uchováváme v chladničce a podle potřeby média rozvaříme v mikrovlnné troubě.

3.7 Sterilizace kultivačních médií

Kultivační média a sterilní destilovanou vodu sterilizujeme autoklávováním (sterilizace horkou parou, teplota 121 °C; přetlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min objem médií a destilované vody v lahvích (100 a 300 ml).

Pozn. Autokláv obsluhuje pouze proškolená osoba.

3.8 Příprava zásobního a pracovního roztoku oryzalinu

Připravíme 10 mM zásobní roztok oryzalinu (ZRO) podle Greplová a kol. (2009), a to rozpuštěním navážky 34,6 mg oryzalinu v 10 ml dimethylsulfoxidu (DMSO), roztok uchováváme v lahvi se závitem ve tmě v lednici. Ze zásobního roztoku si připravíme 1 mM pracovní roztok (PRO): 1 ml ZRO napipetujeme do 10 ml sterilní destilované vody, roztok uchováváme v malé lahvi se závitem ve tmě v lednici.

Medium MS (300 ml) připravené v lahvích rozvaříme v mikrovlnné troubě a požadovanou koncentraci oryzalinu v médiu přidáme již ve flowboxu dávkovací pipetou z pracovního roztoku oryzalinu (5 µM = 1,5 ml PRO a 10 µM = 3 ml PRO, Tabulka 2) medium promícháme, rozléváme do sterilních Erlenmeyerových baněk (30 ml), překryjeme zpět alobalem a necháme ztuhnout.

Pozn. Média připravujeme před použitím. Při práci s oryzalinem dodržujeme bezpečnostní předpisy doporučené výrobcem!

Tabulka 2: Příprava médií s oryzalinem z pracovního roztoku (PRO)

objem média v ml	koncentrace oryzalinu v médiu	
	5 μ M	10 μ M
100	0,5 ml	1,0 ml
300	1,5 ml	3,0 ml

4 Postup ovlivnění rostlinného materiálu oryzalinem

4.1 Mikropropagace donorového rostlinného materiálu

Jedním z faktorů metodiky je příprava dostatečného počtu rostlin v rámci klonu.

Získaný rostlinný materiál (délka prýtů cca 8 cm) kultivujeme ve zkumavkách na MSM médiu. Donorovou rostlinu položíme na sterilní filtrační papír, skalpelem odřežeme kořínky a prýt rozřežeme na segmenty s minimálně třemi páry listů, také boční prýty oddělíme a kultivujeme ve zkumavkách na médiu MSM (0,1 mg/l IBA; 0,1 mg/l BAP a 4 mg/l kyseliny askorbové).

Při následných pasážích opět odstraníme kořínky a segmentujeme rostlinu na části s minimem 3 páru listů, boční prýty oddělujeme a sadíme již na médium MSR ve zkumavkách (Obr. 1). Zmnožení při pasáži po 6 týdnech je 2–6 explantátů/rostlin na 1 vysazený explantát. Po získání dostatečného množství rostlinek je část rostlin použita pro experimenty s oryzalinem.

4.2 Ovlivnění oryzalinem

Segmenty prýtů 1,5–2 cm dlouhé s 1 párem listů, kdy jeden list z páru odstraníme (Obr. 2A), kultivujeme na pevném médiu MS doplněném o danou koncentraci oryzalinu: 0 kontrola, 5 a 10 μ M roztok v Erlenmayerových baňkách (30 ml média, 10–12 segmentů, Obr. 2B, 3) po dobu 2 týdnů v termostatu, tma, 25 °C.

Pozn. Médium s oryzalinem má žlutou barvu. Při manipulaci s roztoky oryzalinu používáme chirurgické rukavice. Média s obsahem oryzalinu, roztoky

oryzalinu a použité špičky sbíráme do určených skleněných nebo plastových nádob a likvidujeme jako nebezpečný odpad.

4.3 Kultivace ovlivněného materiálu a regenerace rostlin

Po 2 týdnech odřežeme 1–2 mm z bazální části všech segmentů (včetně kontroly, Obr. 4) a segmenty pasážujeme na medium MSR s 20 mg kyseliny askorbové v Erlenmayerových baňkách (30 ml média). Po 2 týdnech zelené segmenty (nekrotické likvidujeme) po jednom pasážujeme na MSR médium do zkumavek (1 segment / 1 zkumavka, pokud prorůstá (zvětšuje se) úžlabní pupen, odstraníme i zbývající list segmentu) a umístíme do kultivační místnosti (16 h/8 h den/noc, $22 \pm 2^\circ\text{C}$), Obr. 5. Pasáže opakujeme po 6 týdnech opět na médium MSR. Každý prýt prorůstající z úžlabního pupenu, každého segmentu, vedeme a následně testujeme jako jeden subklon, který kultivujeme a opakovaně pasážujeme na medium MSR v intervalech 6 týdnů.

Z prorůstajících rostlin, včetně kontroly, které mají již viditelné listy, odbíráme list pro flowcytometrii.

Pozn. Prorůstání úžlabních pupenů ze segmentů rostoucích 2 týdny na médiu MS s oryzalinem je velmi pomalé ve srovnání s prorůstáním prýtů ze segmentů rostoucích jen na médiu MS (kontrola).

4.4 Mikropropagace polyploidních rostlin

Průtokovou cytometrií potvrzené (zjištěné) polyploidní rostliny společně s kontrolními (bez ovlivnění oryzalinem) udržujeme a množíme *in vitro* na médiu MSR, aby nedocházelo k tvorbě kalusu a vitrifikaci prýtů na bázi rostliny (1 získaný polyploid je 1 klon), Obr. 6.

Při pasáži, odstraníme kořinky a segmentujeme rostlinu na části s minimem 3 páru listů, apex s 1 párem listů, také boční prýty oddělujeme a sadíme na kultivační médium. Zmnožení je pomalejší než v bodě 4.1, při pasáži po 6 týdnech jsou 2–4 rostliny z explantátu rostliny, může ještě docházet k postupné nekrotizaci a odumírání některých polyploidních rostlin.

Po získání dostatečného množství rostlin v subklonech, část rostlin ze subklonů včetně kontroly, převedeme do nesterilních podmínek pro další testování a hodnocení (tvar listů, velikost stomat) a část ponecháme a kultivujeme.

4.5 Převod polyploidních rostlin do nesterilních podmínek

Rostliny 4–5 cm dlouhé pasážujeme na pevné MS médium bez hormonů do Erlenmeyerových baněk (objem baňky 100 ml, 30 ml média, 4 rostliny). V aseptickém prostředí flowboxu separujeme jednotlivé rostliny, odstraníme kořeny a staré zažloutlé listy. Erlenmeyerovy baňky překryjeme alobalem, uzavřeme parafilmem a umístíme do kultivační místnosti.

Před převodem do nesterilních podmínek odstraníme alobalové víka a Erlenmeyerovy baňky překryjeme potravinářskou fólií minimálně po dobu 1 týdne. Baňky s rostlinami opět umístíme do kultivační místnosti.

Rašelinové tablety (rašelinové sadbovače, Jiffy) namočíme ve vodě. Nejprve rostliny vyjmeme z baněk, kořeny důkladně opláchneme pod tekoucí vody (zbavíme se zbytků média), delší kořeny zkrátíme a odstraníme staré listy (Obr. 7A). Připravené rostliny jednotlivých subklonů (nezaměnit) umístíme a upevníme v rašelinových sadbovačích, každý subklon zvlášť do plastového minipařeniště, které přeneseme do fytotronu nebo do skleníku (Obr. 7B, 8A). Podle potřeby zaléváme a provětráváme. Podle vzrůstu rostlin a potřeby přesazujeme do květináčů s vhodným substrátem a zároveň morfologicky hodnotíme rozdíly mezi rostlinami, např. růst, tvar a velikost listů (Obr. 8B).

4.6 Hodnocení rostlin

Regenerované rostliny, které byly získány s prýtových segmentů po ovlivnění oryzalinem a také kontrolní rostliny hodnotíme metodami uvedenými níže.

4.6.1 Flowcytometrie

Pro stanovení DNA-ploidní úrovně *in vitro* *Humulus lupulus* ovlivněných oryzalinem o koncentraci 5 a 10 μM , z každého jedince ve flowboxu odebereme nepoškozený list, včetně kontrolních rostlin bez přídavku oryzalinu. Měření provedeme na průtokovém cytometru značky Partec CyFlow ML za použití vnitřního standardu se známým obsahem DNA – *Glycine max* Merr. ‘Polanka’ ($2C = 2.50 \text{ pg DNA}$). Do Petriho misky vložíme stejné množství příslušného standardu a vzorku a nasekáno žiletkou v 1,5 ml LB01 pufru, pH 7,8 a přefiltrováno přes 0,22 μm nylonový filtr

do zkumavky. K homogenátu napipetujeme 50 µl fluorescenčního barviva DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), které svou interkalární vazbou obarví chromosomy v řetězci DNA. Na lineární stupnici grafického výstupu (512kanalová škála) je hladina ploidie stanovena na základě poměru vzdálenosti mezi G1 vrcholy (píky) standardu a vzorku (index), Obr. 9. U každého vzorku změříme 3 000 jader s CV v rozsahu 3–6 %.

4.6.2 Počítání chromozomů z kořenových špiček

Předpůsobení: kořenové špičky ponoříme do roztoku 8-hydroxychinolini (0,008 M) a uložíme po dobu 16 hodin do lednice (4 °C–8 °C). Tím dosáhneme vyššího počtu metafázních figur pro následnou analýzu počtu chromozómů.

Fixace: kořenové špičky po předpůsobení promyjeme destilovanou vodou a následně umístíme do Carnoyovy fixáže (3 : 1 – 96% etanol : ledová kyselina octová) po dobu min. půl hodiny. Poté fixovaný materiál převedeme do 96% etanolu a pak do 70% etanolu. V tomto roztoku můžeme materiál uchovávat v lednici po delší dobu.

Barvení: Fixovaný materiál vyjmeme z 70% etanolu a propláchneme v destilované vodě. Následně hydrolyzujeme v 5N HCl po dobu 25 minut při pokojové teplotě. Po té opět propláchneme v destilované vodě a barvíme 30–60 minut v Schiffově činidle (při pokojové teplotě). Po barvení v činidle materiál opláchneme v destilované vodě a macerujeme v 45% kys. octové po dobu 1 minuty. Takto připravené kořenové špičky roztlačíme na podložním sklíčku v kapce 45% kys. octové a pozorujeme metafázní figury pod mikroskopem (Obr. 10).

4.6.3 Stanovení ploidie podle velikosti průduchů (stomat)

Princip metody je, že na povrch spodní epidermis (pokožku) listu nanese vrstvičku rychle tuhnoucího bezbarvého laku na nehty (vybereme si rovnou část epidermis, bez výrazných žilek), necháme zaschnout, přelepíme místo na listu bezbarvou izolepou (aby nevznikly vzduchové bubliny, pak opatrně sejme a přelepíme izolepu na čisté podložní sklo a získáme odlitek (otisk) reliéfu (mikroreliéf) epidermis s průduchy (Obr. 11), u kterého můžeme snadno pozorovat stavbu epidermis, uspořádání, hustotu průduchů

a měřit velikost průduchů (délku a šířku) a tím orientačně stanovit ploidii. Tento preparát můžeme uchovat po dlouhou dobu.

Pro samotné měření můžeme využít okulárový mikrometr a objektivní mikrometr, máme-li vybavení k mikroskopu, můžeme provést přesnější měření.

5 Srovnání novosti postupů

Předkládaná „Metodika *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.)“ poprvé popisuje efektivní postup *in vitro* polyploidizace chmele pomocí oryzalinu, a to kultivací prýtových segmentů na kultivačním médiu doplněném 5 a 10 μ M oryzalinem. Metodika je doložena kompletním složením kultivačních médií, originálními výsledky získanými hodnocením z experimentů a obrazovou přílohou. Úspěšnost polyploidizace metodou *in vitro*, tj. získání tetraploidních rostlin, se pohybuje podle donorového rostlinného materiálu, srovnání mezi testovanými genotypy je uvedeno v Tabulce 3.

In vivo a *in vitro* polyploidizace v rámci šlechtění zemědělských plodin je používanou metodou a jako polyploidizačních agens je často používán kolchicin nebo oryzalin. Výhodou oryzalinu pro zvýšení ploidie je použití nižších koncentrací při ovlivnění k získání polyploidních rostlin a pro člověka i životní prostředí jeho nižší toxicita.

6 Popis uplatnění metodiky

„Metodika *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.)“ představuje optimalizovaný postup úspěšné *in vitro* aplikace oryzalinu v kultivačním médiu na prýtové segmenty k získání tetraploidních (polyploidních) rostlin chmele schopných převodu do polních podmínek. Metodika je určena pro šlechtitele chmele v ČR, svaz pěstitelů chmele v ČR, studenty všech typů škol, kde je problematika rostlinných biotechnologií a hlavně šlechtění rostlin zahrnuta v rámci akreditované výuky.

7 Ekonomické aspekty

Ekonomickým přínosem je získávání velkého množství nového šlechtitelského materiálu chmele s vysokým potenciálem pro další šlechtění, zkrácení šlechtitelského procesu a urychlení tvorby nových ekonomicky zajímavých odrůd, celkový přínos lze odhadnout do 50 tisíc ročně.

Chmel s polyploidním genomem může poskytnout pro šlechtění řadu nových vlastností (hlavně v obsahu aromatických látek) aniž by byl současnou legislativou označen za GMO a odvozené odrůdy z těchto genotypů budou mít snadnější přístup na evropský trh.

Pro pracoviště s vybavenou laboratoří pro explantátové kultury není zapotřebí dalších nákladů k uplatnění metodiky.

8 Dedikace

Metodika je výsledkem řešení v rámci projektu MZe č. NAZV QJ1510160 „Nové technologie získávání aktivních látek z léčivých a aromatických rostlin jako zdrojů účinných látek botanických pesticidů a potravinových doplňků“.

Metodika je veřejně přístupná na adrese: www.botany.upol.cz/vyzkum/.

9 Seznam publikací, které předcházely metodice

- CÁPAL P., ONDŘEJ V., 2014. Expression and epigenetic profile of protoplast cultures (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 50(6): 789–794.
- MORICOVÁ P., ONDŘEJ V., NAVRÁTILOVÁ B., LUHOVÁ L. 2013. Changes of DNA methylation and hydroxymethylation in plant protoplast cultures. *Acta Biochim Pol*, 60(1), 33–36.
- NAVRÁTILOVÁ B., SKÁLOVÁ D., ONDŘEJ V., KITNER M., LEBEDA A. 2011. Biotechnological methods utilized in *Cucumis* research – a review. *Hort Sci (Prague)*, Vol. 38, No:4 150–158.
- NAVRÁTILOVÁ B., ŠVĚCAROVÁ M., ONDŘEJ V., 2015. Micropropagation of *Thymus vulgaris*. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 61(3): 26.

- NAVRÁTILOVÁ B., ŠVÉCAROVÁ M., ONDŘEJ V., 2017. *In vitro* cultures and polyploidization of blue bugle (*Ajuga reptans* L.). Plant Cells In Vitro: Fundamentals and Applications II, Programme and abstracts, Vienna, Austria, p. 34.
- ONDŘEJ V., NAVRÁTILOVÁ B., PROTIVÁNKOVÁ I., PITERKOVÁ J., SEDLÁŘOVÁ M., LUHOVÁ L., LEBEDA A. 2010. Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. Journal of Experimental botany, Vol. 61, 9: 2395–2401.
- ŠVÉCAROVÁ M., ONDŘEJ V., NAVRÁTILOVÁ B., 2017. *In vitro* micropropagation and polyploidization using oryzalin of *Thymus vulgaris*. Plant Cells In Vitro: Fundamentals and Applications II, Programme and abstracts, Vienna, Austria, p. 23.
- ŠVÉCAROVÁ M., NAVRÁTILOVÁ B., ONDŘEJ V. 2018. *In vitro* polyploidization of *Ajuga reptans* L. using oryzalin. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 60/2: 75–79, DOI: 10.24425/118057.
- ŠVÉCAROVÁ M., NAVRÁTILOVÁ B., HAŠLER P., ONDŘEJ V. Artificial induction of tetraploidy in *Humulus lupulus* L. using oryzalin. Acta Agrobotanica (submitted).

10 Seznam použité literatury

- GREPLOVÁ M., POLZEROVÁ H., DOMKÁŘOVÁ J., 2009. Intra- and inter-specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*. Plant Breeding 128: 651–657.
- MALIAR T., NEMEČEK P., ÜRGEOVÁ E., MALIAROVÁ M., NESVADBA V., KROFTA J., VULGANOVÁ K., KROŠLÁK E., KRAIC J., 2017. Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. Chemical Papers 71: 41–48.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473–497.
- NESVADBA V., CHARVÁTOVÁ J., ŠTEFANOVÁ L., 2017. Nové odrůdy a perspektivní genotypy chmele. Kvasný Průmysl, 63, č. 5: 237–240.
- NESVADBA V., POLONČÍKOVÁ Z., HENYCHOVÁ A., 2012. Šlechtění chmele v České republice. Kvasný Průmysl 58, č. 2: 36–39.
- TOSCA A., PANDOLFI R., CITTERIO S., FASOLI A., SGORBATI S., 1995. Determination of flow cytometry of the chromosome doubling capacity of oryzalin and colchicine in gynogenetic haploids of gerbera. Plant Cell Reports 14: 455–458.
- TROJAK-GOLUCH A., SKOMRA U., 2013. Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. Breeding Science 63: 393–399.

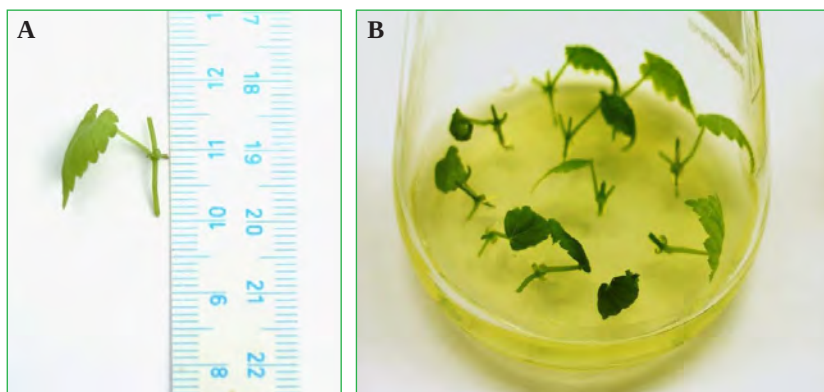
Přílohy

Tabulka 3: Srovnání úspěšnosti *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u použitého donorového materiálu chmele

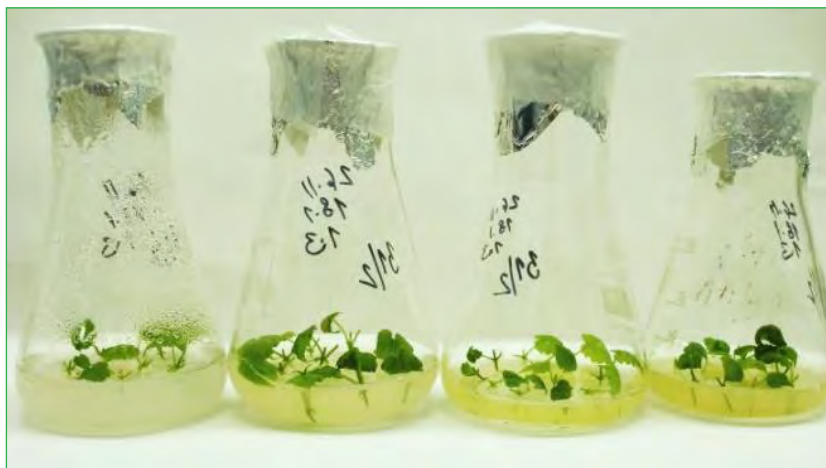
oryzalin	počet ovlivněných prýtových segmentů	počet rostlin získaných po ovlivnění	flowcytometr		počet 4n rostlin/ ovlivněných explantátů	počet 4n rostlin/ regen. rostliny
			2n	4n	%	%
			Sládek			
5 μM	34	13	10	3	8,82	23,08
10 μM	34	2	1	1	2,94	50,0
			Osvaldův klon 31			
5 μM	31	11	5	6	19,35	54,55
10 μM	32	6	2	4	12,50	66,67
			Osvaldův klon 72			
5 μM	27	6	2	4	14,81	66,67
10 μM	31	10	3	7	22,58	70,0
			Osvaldův klon 114			
5 μM	32	14	11	3	9,38	21,43
10 μM	36	12	9	3	8,33	25,00



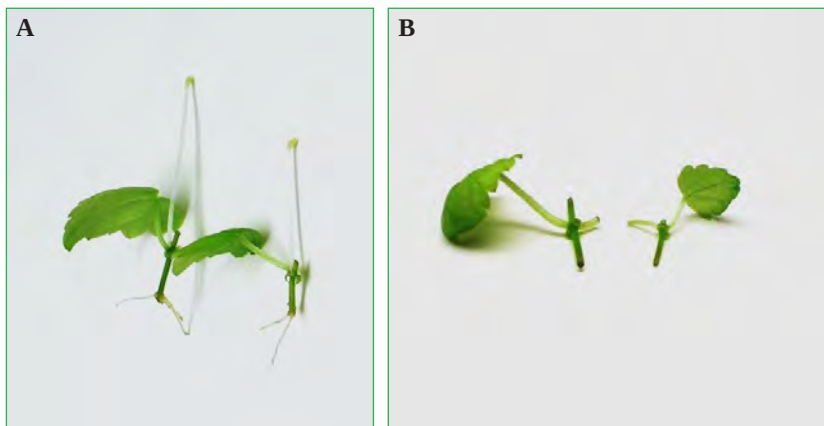
Obrázek 1: Mikropropagace na MSM médiu (A) a rostlina před odběrem prýto-
vých segmentů (B)



Obrázek 2: Připravený prýtový segment (A), vysazené segmenty na médiu s ory-
zalinem (B)



Obrázek 3: Kultivace prýtových segmentů na médiu s oryzalinem, vlevo kontrola bez oryzalinu, uprostřed dvě baňky s 5 μ M a vpravo s 10 μ M roztokem oryzalinu



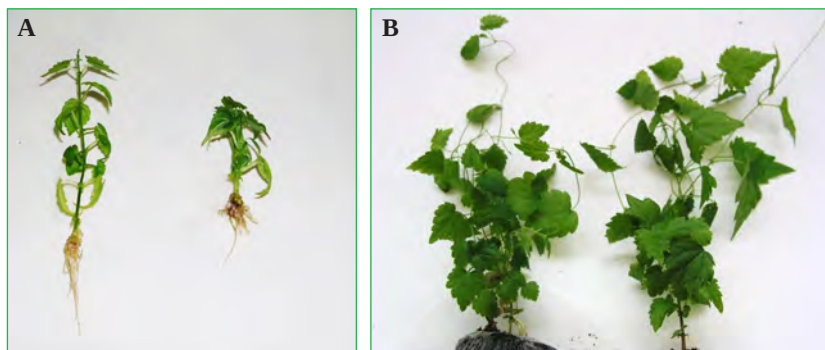
Obrázek 4: Srovnání prorůstání úžlabních pupenů po 2 týdnech, Osvaldův klon č. 72, kontrola (A) a segmenty ovlivněné 5 μ M oryzalinem v médiu (B)



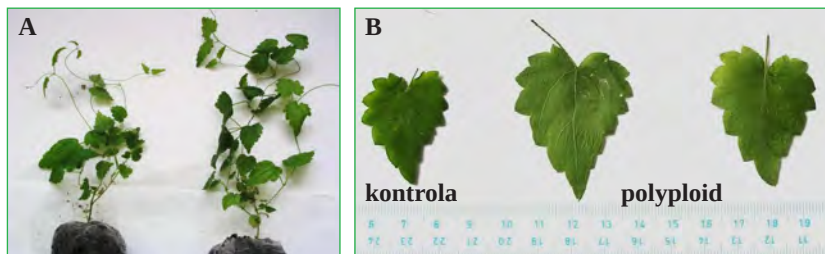
Obrázek 5: Osvaldův klon č. 72, prorůstající kontrola (A) a segmenty ovlivněné 5 µM oryzalinem již po odstranění listu (B)



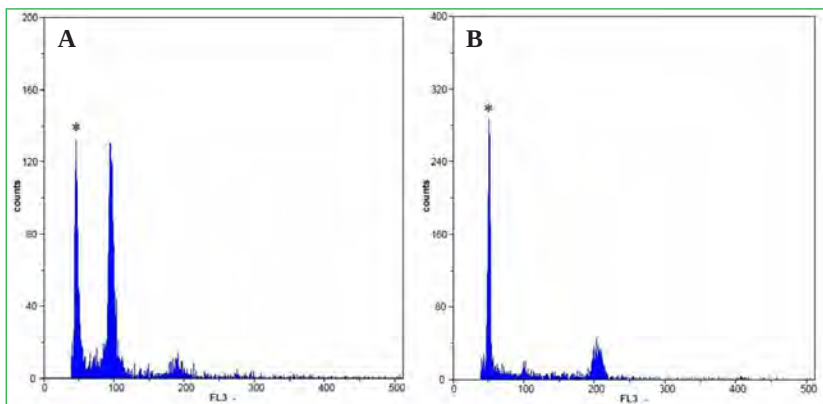
Obrázek 6: Prorůstající rostliny na MSR médiu ve zkumavkách, vlevo kontrola, uprostřed a vpravo po ovlivnění oryzalinem (A), mikropropagace polyploidního klonu (B)



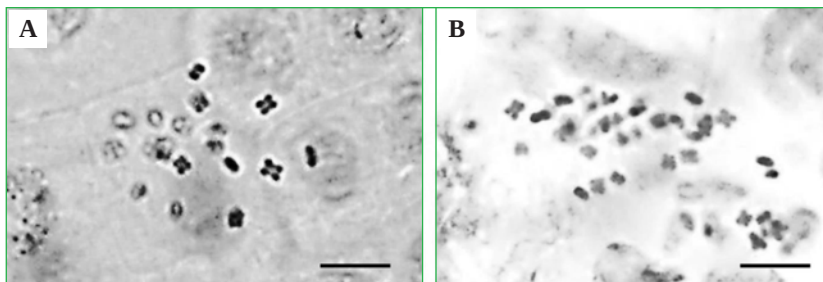
Obrázek 7: Osvaldův klon č. 114, vlevo kontrola vpravo polyploid před vysazením do Jiffů (A) a po 2 měsících (B)



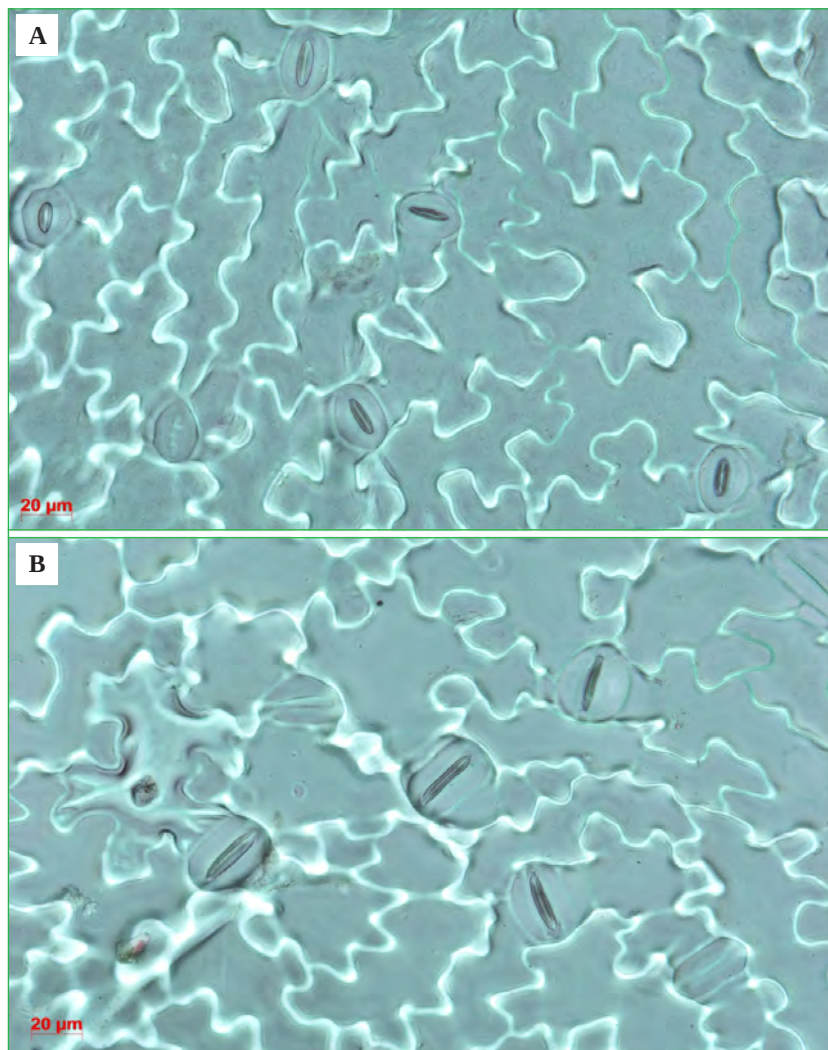
Obrázek 8: Osvaldův klon č. 31, srovnání: vlevo kontrola a vpravo polyploidní rostlina v Jiffech 2 měsíce od převodu z *in vitro* (A), srovnání tvaru a velikosti listů z 3. páru od apexu kontroly a polyloidů (B)



Obrázek 9: Grafický výstup z měření průtokového cytometru značky Partec CyFlow ML. Na ose x je 512kanálová škála, podle které jsou hodnoceny polohy piků. Na pozici 50 je umístěn vnitřní standard (*), na pozici 100 je 2× cytotyp, na pozici 200 je 4× cytotyp. Na ose y je počet analyzovaných částic



Obrázek 10: Srovnání počtu chromozomů kontroly (A) a polyploidní rostliny (B), délka úsečky 5 µm



Obrázek 11: Srovnání velikosti průduchů u kontroly (A) a polyploidní rostliny (B) pomocí otiskových preparátů (délka úsečky 20 µm, zvětšení 10×20)

Metodika *in vitro* polyploidizace pomocí oryzalinu u rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.)

Autoři textu:

RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

Mgr. Michaela Švécarová, Ph.D.

doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Katedra botaniky PřF Univerzity Palackého v Olomouci

Autoři obrázků:

RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D. (obr. 1–8)

Mgr. Michaela Švécarová, Ph.D. (obr. 9)

doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D. (obr. 10)

doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D. (obr. 11)

Výkonný redaktor prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Odpovědná redaktorka Mgr. Lucie Loutocká

Technická redaktorka RNDr. Anna Petříková

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou

Vydala Univerzita Palackého v Olomouci

Křížkovského 8, 771 47 Olomouc

www.vydavatelstvi.upol.cz

www.e-shop.upol.cz

vup@upol.cz

Olomouc 2018

1. vydání

Náklad: 50 výtisků

Online verze metodiky je veřejně přístupná na www.botany.upol.cz/vyzkum/

ISBN 978-80-244-5389-7 (print)

ISBN 978-80-244-5390-3 (online : PDF)

Neprodejná publikace

VUP 2018/0247 (print)

VUP 2018/0248 (online : PDF)

