

Metodika časně detekce obnovitelů fertility pro CMS Ogu-INRA v mikrosporových embryích řepky olejky



Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu NAZV
QJ 1510172 Využití nekonvenčních výchozích materiálů,
biotechnologických metod a efektivních postupů
v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D., Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.
Ing. Marie Příbylová, Mgr. Alois Hilgert-Delgado, Ph.D.
Ing. Vratislav Kučera, CSc., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Praha, září 2016

Metodika časně detekce obnovitelů fertility pro CMS Ogu-INRA v mikrosporových embryích řepky olejky

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu NAZV
QJ 1510172 Využití nekonvenčních výchozích materiálů,
biotechnologických metod a efektivních postupů
v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D., Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.
Ing. Marie Příbylová, Mgr. Alois Hilgert-Delgado, Ph.D.
Ing. Vratislav Kučera, CSc., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Praha, září 2016

Metodika časn  detekce obnovitelů fertility pro CMS Ogu-INRA
v mikrosporových embryích řepky olejky

Miroslav Klíma a kol.
klima@vurv.cz

V zkumn   stav rostlinn  výroby, v.v.i., Praha-Ruzyně
Jiho esk  univerzita v  esk ch Budějovicích,  esk  Budějovice

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu NAZV
QJ 1510172 „**Využití nekonvenčních výchozích materiálů, biotechnologických
metod a efektivních postupů v liniov m a hybridním šlechtění ozimé řepky**“

Oponenty metodiky byli:

Ing. Iva Viehmannová, Ph.D.,  esk  zem d lsk  univerzita v Praze
Ing. Petr Zehnálek, ÚKZÚZ ZS Hradec nad Svitavou

Pod l autorů na vypracování metodiky:

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D. (40 %),
Ing. Lenka Havl ckov , Ph.D. (30 %),
Ing. Marie P rbylov  (10 %),
prof. Ing. Vladislav  urn, Ph.D. (10 %),
Mgr. Alois Hilgert-Delgado, Ph.D. (5 %),
Ing. Vratislav Kučera, CSc. (5 %)

  V zkumn   stav rostlinn  výroby, v.v.i., 2016

  Jiho esk  univerzita v  esk ch Budějovicích, 2016

Foto:   Klíma M.

Vydáno bez jazykov  úpravy

ISBN 978-80-7427-233-2

Obsah

I. Cíl metodiky	7
II. Vlastní popis metodiky	7
III. Srovnání novosti postupů	15
IV. Popis uplatnění metodiky	15
V. Ekonomické aspekty.....	15
VI. Seznam použité související literatury	17
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	19
VIII. Přílohy	21
Tabulka 1. Médium NLN –13 (Lichter 1985)	21
Tabulka 2. Médium MS (Murashige a Skoog 1962).....	21
Tabulka 3. Diferenciační médium DM (Klíma <i>et al.</i> 2004).....	22
Tabulka 4. Regenerační médium RM (Klíma <i>et al.</i> 2004)	23
Příprava roztoku trifluralinu.....	23
Obr. 1. Mikrospory – převažující zastoupení středně jednojaderného stádia	25
Obr. 2. Mikrospory – převažující zastoupení pozdně jednojaderného až dvoujaderného stádia	25
Obr. 3. Vývojová stádia mikrosporových embryí.....	26
Obr. 4. Populace mikrosporových embryí na tekutém médiu NLN v různých vývojových stádiích	26
Obr. 5. Dobře vyvinutá kotyledonární embrya k pasážování na tuhé médium	27
Obr. 6. Embrya na diferenciačním médiu před ořezáváním děložních lístků	27
Obr. 7. Embryo před- a po oříznutí děloh na diferenciačním, resp. regeneračním médiu	28
Obr. 8. PCR detekce se specifickými primery pro úsek genu PPR-B.....	28

I. Cíl metodiky

Cílem předkládané metodiky je etablovat komplexní, rychlejší a spolehlivější postup, umožňující přípravu výchozího rostlinného materiálu, nedestruktivní identifikaci a následné dopěstování genotypů nesoucích gen obnovy pro CMS Ogu-INRA s využitím metod molekulárního markerování v časných fázích produkce dihaploidů, tj. již ve stádiu mikrosporových embryí.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Úvod

Řepka olejka se řadí mezi nejvýznamnější olejninu, odhad světové produkce pro rok 2016 je 67 mil. tun semene (ANONYM 2016). Česká republika patří díky vysoké intenzitě pěstování a propracované agrotechnice stabilně mezi pět největších producentů řepkového semene v EU. Ozimá řepka je tak v ČR po ozimé pšenici a jarním ječmeni třetí nejvýznamnější tržní plodinou na orné půdě, s každoroční plochou pěstování v rozsahu 350–400 tis. ha. Celosvětovým trendem ve šlechtění řepky olejky je setrvalý růst zastoupení hybridních odrůd; v ČR dnes činí podíl těchto typů odrůd na pěstitelských plochách přes 80 % (BARANYK *et al.* 2015) a předpokládá se další nárůst. V hybridním šlechtění je v EU nejrozšířenější francouzský systém cytoplazmatické pylové sterility (CMS) Ogu-INRA (RENARD *et al.* 1998), kde 2-liniový, fertilní F_1 hybrid vzniká křížením sterilní mateřské s fertilní otcovskou komponentou – obnovitelem fertility (Rf). Tradičním postupem zlepšování Rf linií je jejich křížení s donorem kvality – výkonnou liniovou odrůdou či šlechtitelským materiálem, samosprášení F_1 kříženců, dopěstování všech F_2 rostlin do generativní fáze, křížení jednotlivých fertilních rostlin na sterilní mateřské komponenty a stanovení poměru sterilního / fertilního potomstva z každého křížení (KOPRNA *et al.* 2009). Tento zdlouhavý proces je u ozimé řepky dále prodlužován nutností jarovizační periody. Výsledkem je vysoká prostorová, časová a tím i finanční náročnost celého postupu.

V současnosti se do procesu zlepšování Rf linií pro CMS Ogu-INRA zavádí technologie dihaploidů (DH), kdy lze vytvořit zlepšené, uniformní obnovitele během jedné generace (KLÍMA *et al.* 2008). Jelikož je obnova fertility založena jedním dominantním genem, výsledná populace DH linií štěpí v poměru 1 : 1 (tj. jen cca 50 % DH regenerantů nese *Rfo* gen). Požadované DH linie se pak selektují na základě fenotypového projevu (fertilita a schopnost obnovy fertility po křížení na sterilní mateřskou komponentu, viz výše) nebo pomocí molekulárních markerů (KUČERA *et al.* 2013). Jejich využití v produkci Rf DH linií vyžaduje kultivaci DH regenerantů do stádia, ve kterém je dostatečně velká listová plocha pro izolaci DNA a následné analýzy. Zde popisovaný postup umožňuje odběry rostlinného pletiva v časnějších fázích *in vitro* kultivace.

II.2. Příprava a udržování donorových rostlin

Technické vybavení a materiál

- Výsevní substrát
- Květináče o průměru 8 cm a kontejnery 19 × 19 cm
- Vícesložkové tekuté hnojivo
- Klimatizovaná růstová komora – fotoperioda 16 / 8 h, teplota 18 / 14 °C (den / noc), intenzita osvětlení 84 μmol / m² / s
- Skleník – fotoperioda 16 / 8 h, teplota 15 – 25 / 10 – 15 °C (den / noc), s přisvětlováním (sodíkové výbojky – 210 W)
- Jarovizační komora – fotoperioda 8 / 16 h, teplota 2 – 5 °C, přisvětlování zářivkami
- Lednice – teplota 4 – 5 °C

Pracovní postup

- Výsev semen F₁ kříženců obnovitele fertility a donora kvality ve dvou obdobích, dle etapy odběru poupat:

a) Odběr poupat září – leden

– výsev v průběhu června (rostliny ve fázi nástupu kvetení umístit do klimatizované kultivační komory)

b) Odběr poupat únor – květen

– výsev září – říjen (odběry poupat lze provádět též ve skleníkových podmínkách, pokud teploty nepřesáhnou 25 °C)

- Přepichování klíčenců do květináčků o průměru 8 cm s výsevním substrátem (10 rostlin od genotypu)
- Jarovizace rostlin ve fázi 6 – 10 pravých listů po dobu 7 – 8 týdnů
- Přesazení jarovizovaných rostlin do kontejnerů 19 × 19 cm se zahradnickým substrátem a pěstování ve skleníkových podmínkách (kontrola zdravotního stavu, případné ošetření pesticidy)
- Přemístění rostlin ve fázi prodlužování před tvorbou květenství do klimatizované komory nebo do skleníku, pokud není k dispozici klimatizovaná komora
- Přihnojování v průběhu kvetení roztokem tekutého vícesložkového hnojiva 1 – 2 × týdně
- Pravidelné odstraňování odkvetlých květenství, aby se podpořila tvorba nových poupat

II.3. Odběr poupat

Technické vybavení a materiál

- Nůžky
- Kádinky (200 – 250 ml) s vychlazenou destilovanou vodou
- Lihový fix na popis kádínek
- Cestovní chladnička (termotaška)

Pracovní postup

- Odstrížení částí terminálních a axilárních květenství s neotevřenými poupaty
- Umístění květenství jednotlivých genotypů v kádinkách do termotašky
- Uložení květenství v lednici při 4–5 °C až do vlastního odběru jednotlivých poupat (po dobu maximálně pěti dnů)

II.4. Stanovení vývojové fáze mikrospor

Nezralá pylová zrna jsou schopna procházet embryogenezí pouze v určité fázi svého vývoje – ve středně až pozdně jednojaderném stádiu. Proto se před založením mikrosporové kultury stanovuje délka poupat, která je v korelaci s vývojovým stadiem mikrospor.

Technické vybavení a materiál

- Milimetrový papír
- Pinzeta
- Podložní a krycí sklíčka
- Optický mikroskop

Pracovní postup

- Příprava roztlakových preparátů z prašníků vyjmutých z poupat tří až čtyř velikostí, obvykle v rozsahu 3–4 mm
- Hodnocení vývojového stádia mikrospor pod mikroskopem při zvětšení 400 × až 600 ×
- Stanovení optimální velikosti poupat pro mikrosporové kultury jednotlivých genotypů (převažující zastoupení středně jednojaderných mikrospor, které se vyznačují částečně trojbokým až kulovitým tvarem, čirou cytoplazmou a vakuolou, vyplňující přes 50 % objemu buňky (**obr. 1**); zřetelné generativní jádro v blízkosti exiny v kombinaci se zrnitou cytoplazmou představuje pozdní jednojaderné nebo dvoujaderné stádium (**obr. 2**))

II.5. Mikrosporové kultury

Technické vybavení a materiál

- Flowbox pro práci ve sterilním prostředí
- Stolní centrifuga
- Laboratorní horizontální třepačka
- Binokulární lupa
- Inverzní mikroskop
- Biologický termostat
- Lednice
- Stolní autokláv
- Kultivační místnost – fotoperioda 16/8 h (den/noc), trubicové zářivky, světelná intenzita 250 μmol/m²/s, 25 °C
- Kultivační místnost – fotoperioda 16/8 h (den/noc), trubicové zářivky,

- světelná intenzita $250 \mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$; 19°C
- Laboratorní sklo a pomůcky – plynový nebo lihový kahan, pipety, kyvety (10 – 20 ml), sterilní plastové (PS) Petriho misky o průměru 90 mm, parafilm, silné skleněné tyčinky, nylonové filtry (40 a 70 μm)
- Etanol (čistý a denaturovaný)
- SAVO
- Tekuté kultivační médium NLN (složení viz příloha)
- Roztok diploidizační látky trifluralinu (příprava viz příloha)
- Redestilovaná voda

Pracovní postup

- Odběr poupat odpovídající velikosti do ledem chlazené kádinky v co nejkratším možném čase, aby se předešlo dehydrataci
- Sterilizace poupat 70 % etanolem 2 min. nebo 10 % SAVO 10 min. při větším riziku kontaminace
- Opláchnutí chlazenou sterilní destilovanou vodou 3 × po 5 minutách
- Macerace poupat ve 20 ml kádince v chlazeném NLN médiu pomocí skleněné tyčinky
- Filtrace přes dvojitý nylonový filtr do 20 ml kádinky a doplnění na celkový objem suspenze mikrospor 9 – 10 ml
- Purifikace mikrospor centrifugací v 10 ml kyvetách při 100 g (1000 RPM) po dobu 10 minut
- Odpipetování supernatantu a resuspendování sedimentu v čerstvém chlazeném médiu NLN
- Dvě další centrifugace po 5 minutách se stejným postupem
- Příprava zásobního a pracovního roztoku diploidizační látky trifluralinu (viz příloha)
- Resuspendování pročištěných mikrospor v 10 ml roztoku trifluralinu ($5 \mu\text{mol} / \text{l}$) a v 90 mm sterilní Petriho misce uložení na 18 – 24 hodin v termostatu bez osvětlení při 30°C
- Přepipetování suspenze do 10 ml centrifugační kyvety a odstředění při 1000 RPM po dobu 10 minut
- Resuspendování sedimentovaných mikrospor v temperovaném kultivačním NLN médiu v 50 ml Erlenmeyerově baňce a upravení hustoty na 10^4 mikrospor na 1 ml média
- Kultivace mikrospor v 90 mm Petriho misce uzavřené parafilmem v termostatu při 30°C až do objevení globulárních embryí (10 – 14 dní)
- Přemístění kultur na třepačku (70 RPM) do kultivační místnosti s teplotou 25°C , kde dochází k vývoji kotyledonárních embryí (**obr. 3, 4**)

II.6. Odběr materiálu na extrakci DNA a regenerace celistvých rostlin

Technické vybavení a materiál

- Flowbox
- Kultivační místnost pro explantátové kultury
- Lednice

- Mrazicí box (−20 až −80 °C)
- Autokláv
- Mikrocentrifugační zkumavky s víčkem (tj. eppendorfy o objemu 1,5 ml s kónickým dnem)
- Kultivační média (viz příloha)
- Etanol čistý

Pracovní postup

- Subkultivace kotyledonárních embryí o délce 4–7 mm (**obr. 5**) na agarové diferenciační (DM) médium v 90 mm plastových Petriho miskách po 20 ks
- Umístění kultur v kultivační místnosti s teplotou 19 °C po dobu 8–14 dnů (**obr. 6**)
- Odříznutí částí obou děložních lístků (2/3 až 3/4) (**obr. 7**)
- přemístění odříznutých děložních lístků do mikrocentrifugačních zkumavek
- Očíslování zkumavky a přemístění do mrazicího boxu pro extrakci DNA
- Shodné označení embryí a odebraného materiálu pro DNA analýzu, subkultivace na regeneračním médiu (RM) v 90 mm plastových Petriho miskách po 20 ks pro podpoření vývoje vrcholového meristému
- Extrakce DNA a markerování genu obnovy (viz kapitola II.8)
- Subkultivace vybraných regenerantů s 1–2 pravými lístky (dle výsledků molekulárních analýz) na RM médium v 90 mm plastových Petriho miskách
- Subkultivace regenerantů ve fázi 3–4 pravých lístků na MS médium v plastových kultivačních nádobách
- Subkultivace regenerantů ve fázi 4–5 pravých lístků na MS médium ve 100 ml Erlenmayerových baňkách
- Vysazení regenerantů s dobře vyvinutým kořenovým systémem do nesterilních podmínek

II.7. Dopěstování regenerantů do generativní fáze a přemnožení

Technické vybavení a materiál

- Skleník
- Jarovizační komora
- Výsevní a zahradnický substrát
- Previcur
- Vícesložkové tekuté hnojivo
- Perforovaná fólie
- Izolátory na jednotlivé rostliny z netkané textilie
- Květináče o průměru 8 cm
- Kontejnery 19 × 19 cm

Pracovní postup

- Vyjmutí regenerantů z kultivačních nádob a opláchnutí pod tekoucí vodou a odstranění zbytků agarového média

- Ponoření celých rostlinek do 0,15 % roztoku Previcuru na 20 minut
- Vysazení rostlin do květináčů o průměru 8 cm s výsevním substrátem a zalití roztokem Previcuru
- Zakrytí květináčů perforovanou fólií na 7 – 10 dní pro vytvoření vlhkého mikroklima a pěstování ve skleníku až do doby aktivního růstu rostlin (14 – 18 dní)
- Jarovizace rostlin v klimatizované komoře po dobu 6 až 8 týdnů
- Vysázení jarovizovaných regenerantů do kontejnerů o velikosti 19 × 19 cm, naplněných zahradnickým substrátem
- Umístění vysázených rostlin do vytápěného skleníku s přisvětlováním (v zimních měsících) nebo do venkovních izolátorů
- Provádění pravidelné kontroly zdravotního stavu a preventivní ošetření rostlin proti chorobám a škůdcům
- Průběžná izolace celých rostlin před počátkem kvetení sáčky z netkané textilie

Poznámka:

Přesné rozlišení haploidních a dihaploidních regenerantů se provádí karyologickou analýzou nebo průtokovou cytometrií. V praxi se využívá především hodnocení rostlin podle morfologie květenství a fertility/sterility květů.

II.8. Extrakce DNA a markerování genu obnovy pro CMS Ogu-INRA

Technické vybavení a materiál

- Centrifuga
- Mikrohomogenizátor
- Sada automatických pipet
- Vortex
- Třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok
- Termostat
- Analytické váhy
- pH metr
- Lednice
- Mrazicí box (−20 °C)
- Autokláv
- PCR thermocykler
- Horizontální elektroforéza se zdrojem
- Gel-dokumentační systém
- Mikrocentrifugační zkumavky s víčkem (ependorfky o objemu 1,5 ml s kónickým dnem)
- SDS extrakční pufr (200 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS)
- Isopropylalkohol (2-propanol, isopropanol)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 mM EDTA)
- PPP Master Mix (TopBio)

- Primery (IDT)
- BSA (Sigma)
- PCR ladder – velikostní marker – 100 bp DNA ladder (NEB)
- TBE pufr pro elektroforézu
- Agaróza
- Ethidium bromid (Sigma)
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)
- Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA: somatická embrya, kotyledonární pletiva

Pracovní postup

- DNA je izolována z čerstvého materiálu (odebraného v *in vitro* kultuře a ihned zpracovávaného), nebo z materiálu zamraženého (po odebrání je materiál hluboce zmražen a uchováván při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, krátkodobě je možné uchování i při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Izolace DNA pomocí SDS: tento postup izolace se využívá jako rychlá a jednoduchá metoda izolace DNA při skríningu velkého množství vzorků a vychází z postupu publikovaného v práci EDWARDS *et al.* (1991):
- Rostlinné pletivo (1 – 200 mg) rozdrtíme homogenizátorkem přímo v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce ve 100 μl SDS extrakčního pufru
- K homogenátu přidáme 300 μl extrakčního pufru a 5 s vortexujeme (tato extrakční směs může být ponechána při laboratorní teplotě i déle než 1 hodinu, dokud nejsou všechny vzorky homogenizovány)
- Extrakt centrifugujeme 1 min při 13 000 rpm a 300 μl supernatantu přeneseme do čisté mikrocentrifugační zkumavky
- K supernatantu přidáme 300 μl isopropylalkoholu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, jemně promícháme (3 – 4 \times převrátit zkumavku) a směs necháme 2 min srážet. Centrifugujeme 5 min při 13 000 rpm
- Osušený pelet rozpustíme v 50 μl TE pufru; DNA je stabilní ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ déle než 1 rok
- Postup markerování genu obnovy pro CMS Ogu-INRA je založen na PCR detekci rostlin nesoucích gen pro obnovu fertility (*Rfo*) pomocí specifických primerů pro úsek genu PPR-B pocházejícího z ředkve (*Raphanus sativus*). Pro detekci genu *Rfo* jsou použity primery RsPPRB-F/RsPPRB-R, doplněné o druhý primerový pár 208F/208R, který slouží jako pozitivní kontrola (amplifikace fragmentu vždy přítomného u *B. napus*)

- Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu (HAVLÍČKOVÁ *et al.* 2015):

Primer	Sekvence '5–3'	Annealing
RsPPRB-F	GAAGCTCTTGCTACCCATCG	59°C
RsPPRB-R	TGACATGCTTCGATCTCGTC	59°C
208F	TCGGGATGGAAACCATACTC	59°C
208R	GGTCCCAGATAAGGGGAAAA	59°C

- Duplex PCR byla provedena v objemu 20 μ l, tvořeného 1 \times reakčním pufrem PPP (Top Bio), 1 \times BSA, 0,25 μ M každého primeru (IDT) a 5 – 10 ng templátové DNA
- Schéma pipetování: 10 μ l PPP master mixu, 1 μ l DNA, 0,5 μ l každého primeru (10 μ M), 2 μ l 10 \times BSA, 5 μ l dH₂O (voda do objemu 20 μ l)
- Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:
 - počáteční denaturace: 5 min, 95 °C;
 - 35 cyklů:
 - 30 s, 95 °C,
 - 45 s, 59 °C,
 - 2 min, 72 °C;
 - konečná elongace: 10 min, 72 °C;
 - stop: 4 °C
- PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1 \times TBE pufru
Podmínky separace: 30 V 30 min, 90 V 1 hod a 30 min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se barvením pomocí ethidium bromidu na UV transiluminátoru (**obr. 8**)

III. Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika je svého druhu první česky vydanou komplexní prací, pojednávající o přípravě mikrosporových embryí řepky olejky s následným nede-struktivním markerováním genu obnovy pro CMS Ogu-INRA v dělohách těchto embryí. Metoda extrakce DNA, optimalizovaná na nízké navážky zelené hmo-ty umožňuje spolehlivou izolaci DNA s následnou PCR reakcí a detekcí přísluš-ného genu.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena především pro pracovníky výzkumných a šlechtitelských pracovišť, kteří budou její výsledky využívat ve výzkumu a v zemědělské pra-xi. Metodika bude uplatněna ve šlechtitelských a výzkumných programech, za-měřených na efektivní produkci dihaploidních linií obnovitelů fertility pro cyto-plazmatickou pylovou sterilitu, založenou na systému Ogu-INRA

V. Ekonomické aspekty

V případě typického průběhu *in vitro* regenerace je k dispozici pro detekci genu obnovy dostatek rostlinného pletiva ve formě odřezaných děložních lístků již za cca 4 týdny od založení mikrosporové kultury. Je tedy možné provést operativ-ní selekci regenerantů ještě před pasážováním na regenerační médium, čímž se ušetří náklady na udržování, manipulaci a dopěstování regenerantů bez požado-vaného genu. V praxi to znamená úsporu minimálně 50 % nákladů na výše uve-denou činnost.

Další významná úspora je dána aplikací metody dihaploidů v procesu zlep-šování obnovitelů fertility. Klasickým postupem je jejich křížení s donorem kva-lity, samosprášení F_1 kříženců, dopěstování všech F_2 rostlin do generativní fáze a křížení jednotlivých fertálních rostlin na sterilní mateřské komponenty a sta-novení poměru sterilního / fertálního potomstva z každého křížení. Pokud je po-díl fertálního potomstva ~100 %, u dané výchozí fertální rostliny se předpokládá homozygotní stav genu obnovy. Aby bylo možné podíl fertálního / sterilního po-tomstva objektivně stanovit, je třeba během testů udržovat jednotlivé ověřova-né rostliny i sterilní mateřské komponenty v technické izolaci. Stanovení obno-vy může být dále ovlivněno i extrémními klimatickými podmínkami. Výsledkem je jak vysoká prostorová, časová a tím i finanční náročnost celého postupu, tak i nižší objektivita hodnocení. Dihaploidní systém v kombinaci s časovou selekcí požadovaných genotypů v *in vitro* výše uvedené nedostatky eliminuje. Aplikace DH systému vede k 100 % homozygotizaci během krátkého časového úseku (na rozdíl od běžných postupů inbreedingu). Takto vysoké hodnoty se prakticky nedá žádnou jinou metodou dosáhnout. Je tak zajištěna genetická čistota obno-vitele a jeho naprostá stálost v čase, čímž je dán předpoklad k tvorbě uniform-ních F_1 hybridů.

Náklady spojené s aplikací metodiky lze rozdělit do dvou skupin; na fixní náklady, související s pořízením a odpisy kultivačních komor a přístrojového vybavení, koupí nebo pronájmem pozemků, mzdami kmenových pracovníků apod., a na náklady variabilní, jako je např. spotřeba energií, materiálu a úkolových mezd personálu.

Nezbytným vybavením je specializovaná kultivační komora(-y) s řízeným světelným a teplotním režimem (250 tis. – 1 mil. Kč), laminární box pro práci v aseptickém prostředí (150 – 300 tis. Kč), autokláv pro přípravu kultivačních médií a sterilizaci nástrojů (70 – 120 tis. Kč), biologický termostat (30 – 200 tis. Kč), analytické váhy (20 – 100 tis. Kč), přístroj pro přípravu deionizované vody (20 – 60 tis. Kč), laboratorní vařič (10 – 30 tis. Kč), magnetická míchačka (10 – 20 tis. Kč), předvážky (5 – 10 tis. Kč), nástroje pro dávkování kapalin (3 – 5 tis. Kč) a pH metr (2 – 10 tis. Kč). V případě udržování donorových rostlin v řízených podmínkách, resp. dopěstování a přemnožení rostlin ve skleníku je třeba kalkulovat i pořízení další kultivační komory (300 tis. – 1 mil. Kč), resp. skleníku. Předpokládá se, že uživatelé metodiky již mají částečně nebo kompletně vybavenou laboratoř explantátových kultur, potřebné kultivační komory a zaškolený personál.

Významnou položkou nákladů variabilních je spotřeba elektrické energie na provoz osvětlovacích těles kultivačních boxů a chlazení na požadovanou teplotu. Na jednu donorovu rostlinu řepky je třeba počítat s příkonem 17 – 20 W (sodíková výbojka), na rostlinu v *in vitro* podmínkách 1,5–2,0 W (lineární zářivka). Náklady na chlazení se odvíjejí od způsobu odvodu přebytečného tepla (odsávání, izolace osvětlovacích těles od prostoru s rostlinami apod.). Náklady na přípravu kultivačních médií (250 – 600 Kč/l média) souvisí s kvalitou (čistotou) výchozích chemikálií a složením jednotlivých typů médií. Výsledné jednotkové náklady na produkci požadovaných rostlinných materiálů výrazně ovlivňují i další faktory, jako je fyziologický stav donorových rostlin v průběhu odběrů, regenerační schopnost použitých genotypů, výskyt kontaminací aj. K dalším významným nákladovým položkám patří i např. výdaje spojené s periodickou údržbou a revizí přístrojového vybavení apod.

VI. Seznam použité související literatury

- ANONYM. Rapeseed | Global Rapeseed Production 2016/2017. Global Rapeseed Production. [online]. 12.7.2016 [cit. 2016-09-21]. Dostupné z: <http://www.globalrapeseedproduction.com/>
- BARANYK a kol. (2015). Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2015/16. Praha: Typus Pro Praha s.r.o. ISBN 978-80-87065-59-4.
- EDWARDS K., JHNSTONE C., THOMPSON C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1349.
- KLÍMA M., VYVADILOVÁ M., KUČERA V. (2004): Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Horticultural Science (Prague)*, 31: 119–123.
- KLÍMA M., VYVADILOVÁ M., KUČERA V. (2008). Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44: 30–36.
- KOPRNA R., KUČERA V., MACHÁČKOVÁ I., HORÁČEK J., EHRENBERGEROVÁ J. (2009). Development of fertility restorers of winter oilseed rape with low glucosinolate content for the CMS Ogu-INRA system. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45(3): 123–127.
- KUČERA V., VYVADILOVÁ M., KLÍMA M., ČURN V., HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., MACHÁČKOVÁ I. (2013). Metodika tvorby rodičovských komponent a hybridů ozimé řepky (*Brassica napus* L.) na bázi CMS. VÚRV, v.v.i. Praha, 2013.
- LICHTER R. (1985). From microspores to rape plants. A tentative way to low glucosinolate strains. In: Sorensen H. (ed.): *Advance in the Production and Utilisation of Cruciferous Crops*. Martinus Dordecht, Boston, Lancaster, Nijhoff M., Junk W. Publishers, 268–277.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–97.
- RENARD M., DELOURME R., VALLEE P., PIERRE J. (1998). Hybrid rapeseed breeding and production. In: Thomas, G. and Monteiro, A. (eds.) *Brassica 97, International symposium on Brassicas*, Rennes, Acta Hort. 459, 291–298.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- HAVLÍČKOVÁ L., ČURN V., JOZOVÁ E., KUČERA V., VYVADILOVÁ M., KLÍMA M. (2012): Sequence analysis of the mtDNA region correlated with Shaan 2A cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). Czech J. Genet. Plant Breed. 48: 139–142.
- HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., KLÍMA M., KUČERA V., ČURN V. (2014): Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype. Genetics and molecular biology, 37: 556–559.
- HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., RYCHLÁ A., KLÍMA M., KUČERA V., ČURN V. (2014): Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers. Czech J. Genet. Plant Breed. 50:216–225.
- HAVLÍČKOVÁ L., KLÍMA M., PŘIBYLOVÁ M., HILGERT-DELGADO A.A., KUČERA V., ČURN V. (2015): Non-destructive *in vitro* selection of microspore-derived embryos with the fertility restorer gene for CMS Ogu-INRA in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Electronic Journal of Biotechnology 18: 58–60.
- HAVLÍČKOVÁ L., PŘIBYLOVÁ M., KLÍMA M., ČURN V. (2014): Molekulární detekce genů obnovy fertility pro CMS Ogu-INRA v mikrosporových embryích řepky. Úroda 12, vědecká příloha časopisu, 175–178
- KLÍMA M., VYVADILOVÁ M., KUČERA V. (2004): Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. Horticultural Science (Prague), 31: 119–123.
- KLÍMA M., VYVADILOVÁ M., KUČERA V. (2008): Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. Czech J. Genet. Plant Breed., 42: 30–36.
- KUČERA V., SCHWARZBACH E., KLÍMA M., VYVADILOVÁ M. (2004): Agronomic performance of doubled haploid lines and pedigree-derived lines of winter oilseed rape. Czech J. Genet. Plant Breed., 40: 127–133.
- KUČERA V., VYVADILOVÁ M., KLÍMA M. (2002): Utilisation of doubled haploids in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding. Czech J. Genet. Plant Breed. 38: 50–54
- SMÝKALOVÁ I., VĚTROVCOVÁ M., KLÍMA M., MACHÁČKOVÁ I., GRIGA M. (2006): Efficiency of Microspore Culture for Doubled Haploid Production in the Breeding Project “Czech Winter Rape”. Czech J. Genet. Plant Breed., 42: 58–71.
- ŽALUDOVÁ J., HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., KUČERA V., VYVADILOVÁ M., KLÍMA M., ČURN V. (2013): Marker assisted selection as a tool for detection of *Brassica napus* plants carrying self-incompatibility alleles, in hybrid breeding programs. Romanian Agricultural Research, 30: 1–10.

VIII. Přílohy

Tabulka 1. Médium NLN –13 (Lichter 1985)

Složka		Složka	
A) navážky	[mg/l média]	pH	5,8–6,0
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	125,0	<i>navážky B) a C) (v mg na 100 ml zás. roztoku)</i>	
KNO ₃	125,0	navážky mikroprvků	
KH ₂ PO ₄	125,0	H ₃ BO ₃	1 000,0
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	500,0	MnSO ₄ × H ₂ O	1 894,0
L-serin	100,0	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	1 280,0
L-glutamin	800,0	Na ₂ MoO ₄ × H ₂ O	25,0
L-glutathion	30,0	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	2,5
myo-inositol	100,0	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	2,5
sacharóza	130 000,0	navážky vitaminů	
<i>zásobní roztoky (po 1 ml na l média)</i>		kys. nikotinová	500,0
B) zásobní roztok mikroprvků		thiamin (I.)	50,0
C) zásobní roztoky vitaminů I. – IV.		pyridoxin	50,0
D) ostatní složky		kys. listová * (II.)	50,0
Ferrous sulfate/chelate solution ¹⁾	10 ml (<i>na l média</i>)	biotin * (III.)	5,0
		glycin (IV.)	200,0

složky I. – IV. rozpustit samostatně

* – rozpustit v 1N KOH

1) – firma SIGMA

sterilizace filtrací

Tabulka 2. Médium MS (Murashige a Skoog 1962)

Složka	Navážka (mg/l)	Složka	Navážka (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1 650,000	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	27,800
KNO ₃	1 900,000	Na ₂ × EDTA × 2 H ₂ O	37,300
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	440,000	kys. nikotinová	0,500
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370,000	pyridoxin × HCl	0,500
KH ₂ PO ₄	170,000	thiamin	0,100
KI	0,830	glycin	2,000
H ₃ BO ₃	6,200	inositol	100,000
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	22,300	agar	8 000,000
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,600	sacharóza	30 000,000
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,250	kasein	1 000,000
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025	pH	5,8
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025		

Tabulka 3. Diferenciační médium DM (Klíma et al. 2004)

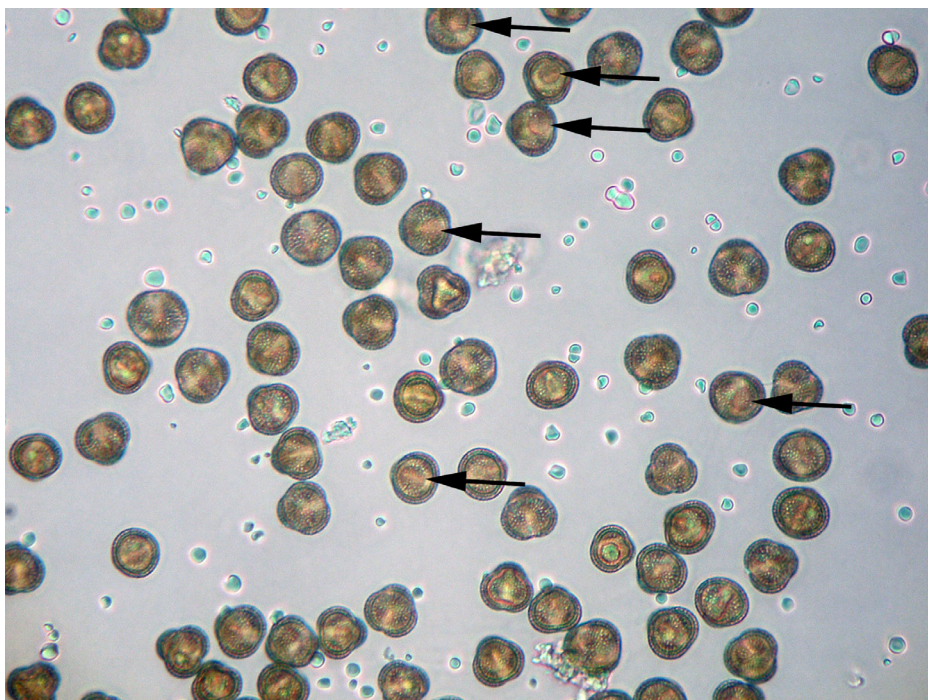
Složka	Navážka (mg/l)	
Makroelementy	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
	KNO ₃	3000
	NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	150
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	500
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	750
	FeNa-EDTA	40
Mikroelementy	H ₃ BO ₃	3
	MnSO ₄ × 4 H ₂ O	10
	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	2
	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025
Vitamíny	Thiamin HCl	10
	Pyridoxin HCl	1
	Kys. nikotinová	1
	Myo-inositol	100
Aminokyseliny	Glutamin	800
	Serin	100
Fytohormony	6-BAP	0,2
	IAA	0,2
Sacharóza		20 g
Agar		8 g
pH		5,8-6,0

Tabulka 4. Regenerační médium RM (Klíma et al. 2004)

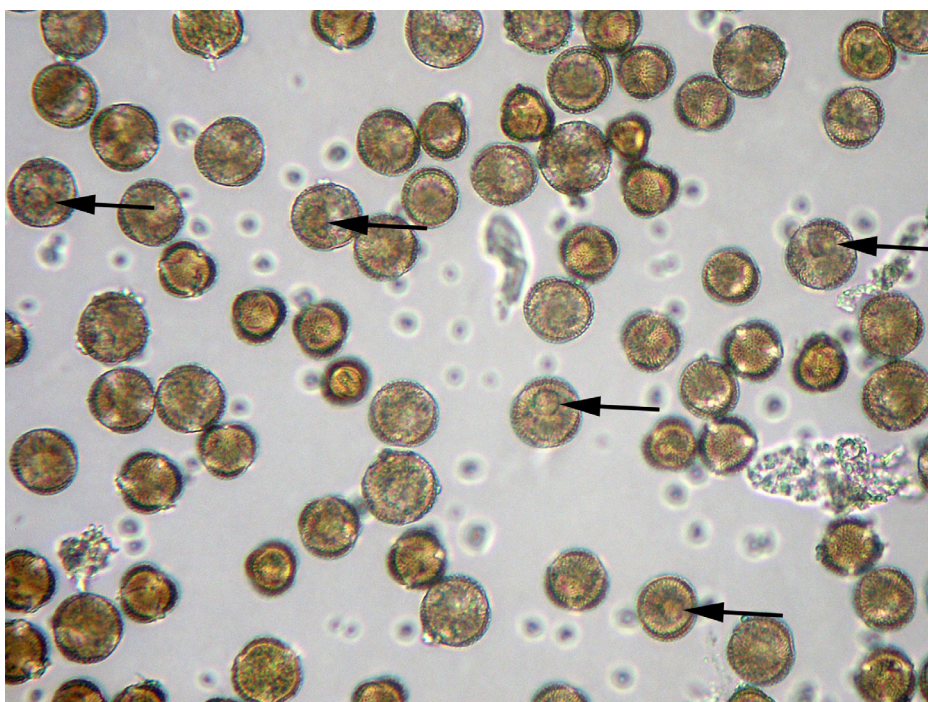
Složka	Navážka (mg/l)	
Makroelementy	(NH ₄)NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	KH ₂ PO ₄	170
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	440
	FeNa-EDTA	36,7
Mikroelementy	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ × 4 H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,025
	KI	0,83
Vitamíny	Thiamin	0,1
	Pyridoxin	0,5
	Kys. nikotinová	0,5
	Myo-inositol	100
	Glycin	2
Sacharóza	10 g	
Agar	10 g	
pH	5,9	

Příprava roztoku trifluralinu

- Rozpuštění 16,76 mg trifluralinu v malém množství acetonu ve sterilních podmínkách ve flowboxu, odpaření acetonu
- Konečné rozpuštění v dimetylsulfoxidu (DMSO) a upravení koncentrace roztoku na 5 mmol/l
- Uložení zásobního roztoku ve sterilních baňkách se šroubovacím víčkem při teplotě 22 °C a ve tmě
- Příprava pracovního roztoku o koncentraci 5 μmol/l přidáním NLN média o teplotě vyšší než 20 °C těsně před použitím pro mikrosporové kultury



*Obr. 1. Mikrospory – převažující zastoupení středně jednojaderného stádia
Šipky označují vakuolu (zvětšení 400 ×)*

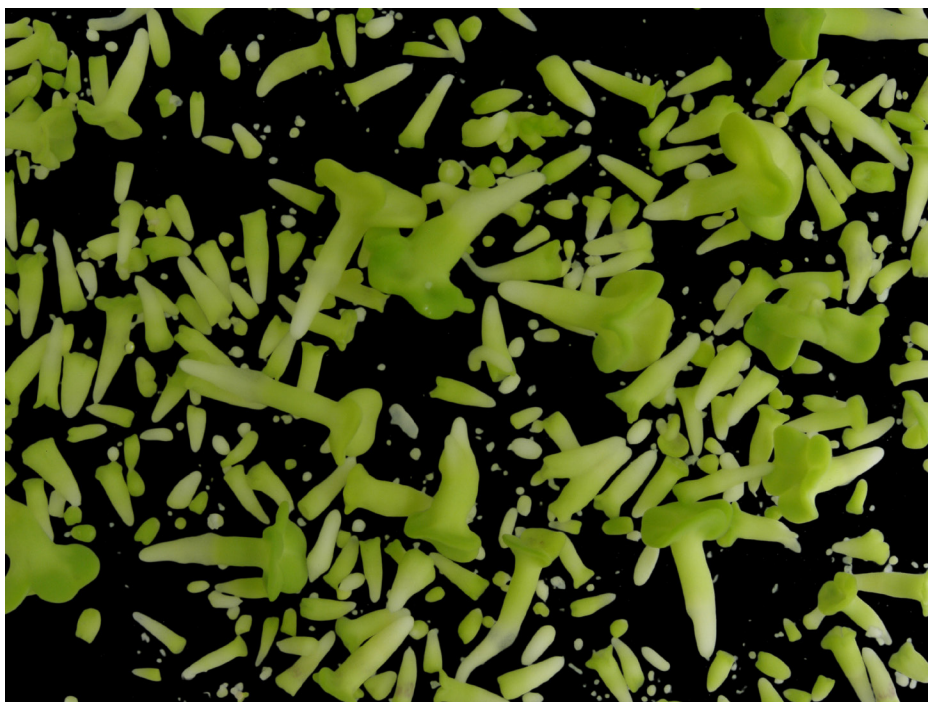


*Obr. 2. Mikrospory – převažující zastoupení pozdně jednojaderného až dvouja-
derného stádia
Šipky označují vegetativní jádro (zvětšení 400 ×)*



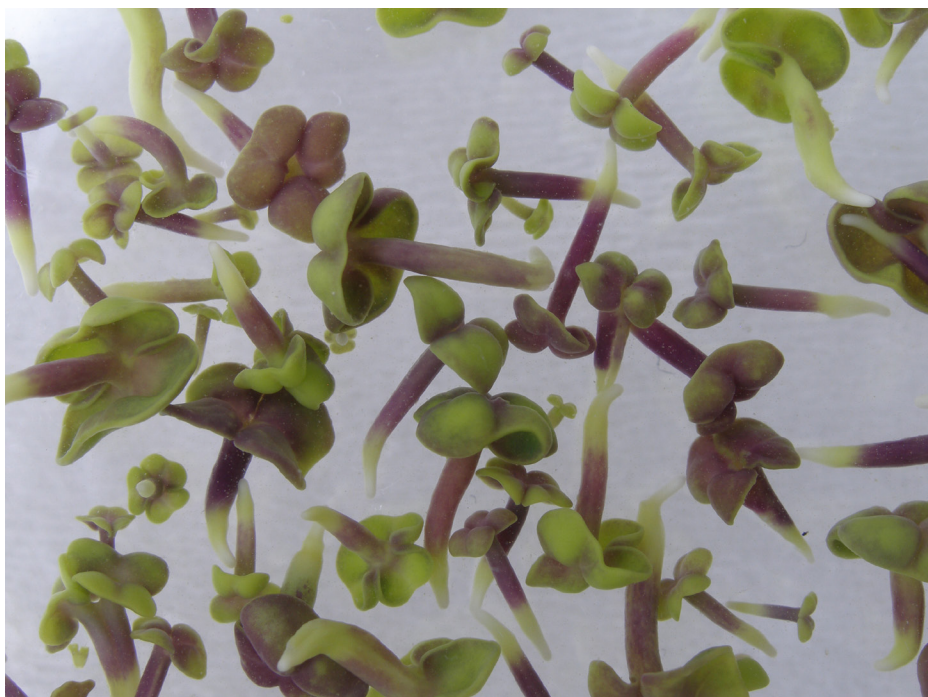
Obr. 3. Vývojová stádia mikrosporových embryí

A–globulární, B–srdčité, C–torpédovité, D–kotyledonární, E–dobře vyvinuté kotyledonární stádium pro pasážování na diferenciační médium

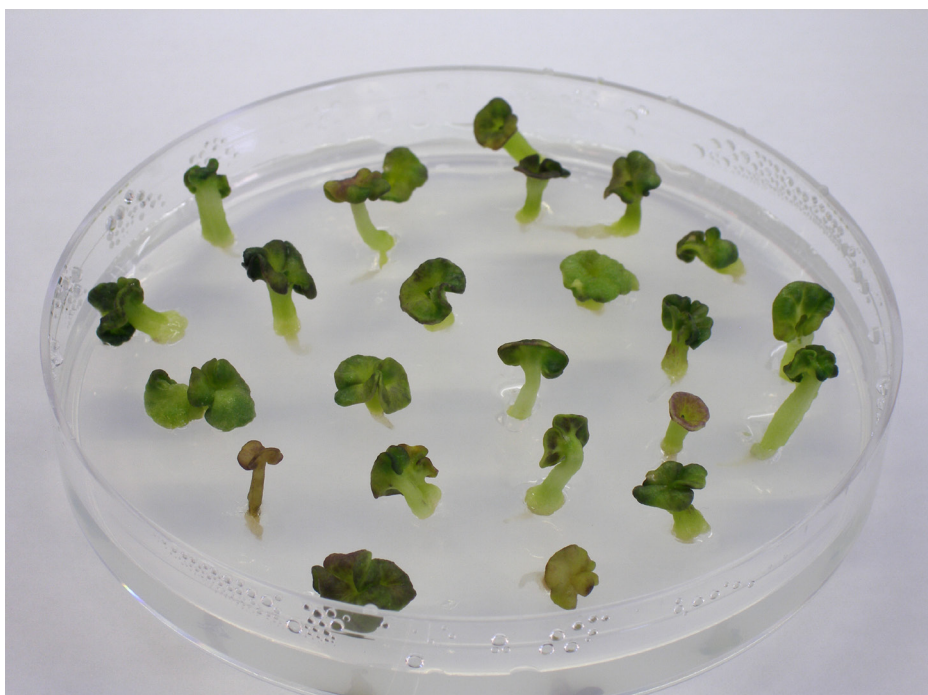


Obr. 4. Populace mikrosporových embryí na tekutém médiu NLN v různých vývojových stádiích

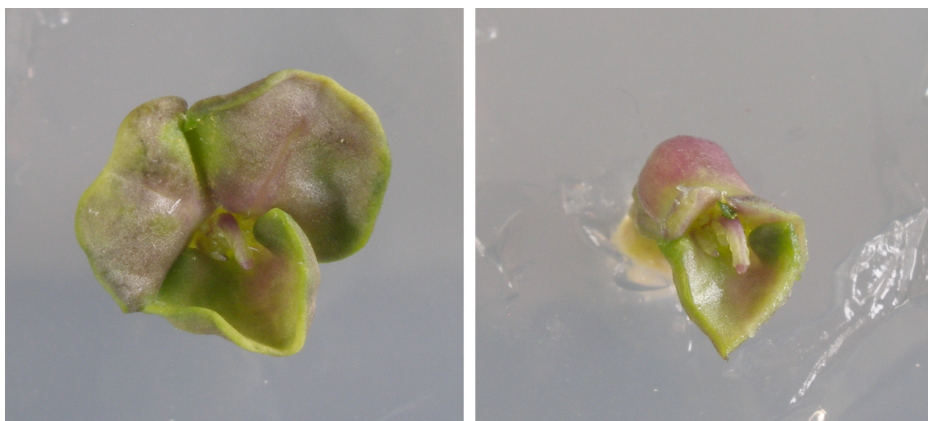
Délka největších embryí 5 mm



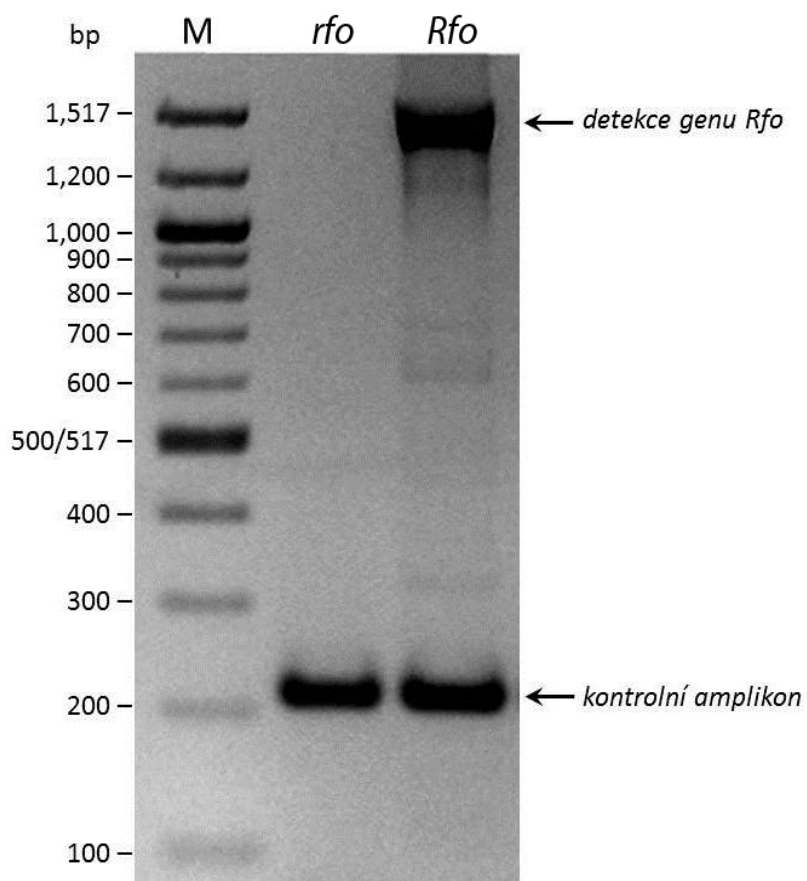
Obr. 5. Dobře vyvinutá kotyledonární embrya k pasážování na tuhé médium
Délka největších embryí 8 mm



Obr. 6. Embrya na diferenciačním médiu před ořezáváním děložních lístků
Průměr kultivační misky 90 mm



Obr. 7. Embryo před- a po oříznutí děloh na diferenciačním, resp. regeneračním médiu



Obr. 8. PCR detekce se specifickými primery pro úsek genu *PPR-B*
 Pro detekci genu *Rfo* použity primery RsPPRB-F/RsPPRB-R (1528pb).
 Druhý primerový pár (208bp) slouží jako pozitivní kontrola.

Název: Klíma M. a kol. (2016): Metodika časně detekce
obnovitelů fertility pro CMS Ogu-INRA
v mikrosporových embryích řepky olejky

Autorský kolektiv: Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.
Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.
Ing. Marie Příbylová
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Mgr. Alois Hilgert-Delgado, Ph.D.
Ing. Vratislav Kučera, CSc.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
Praha 6 – Ruzyně
161 06

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena MZe ČR, osvědčením o certifikaci
č. 70379/2016-MZE-17221

Kontakt na autory: klima@vurv.cz

ISBN 978-80-7427-233-2

Poznámky
