



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin Brambory



**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta, Katedra speciální produkce rostlinné  
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice**



## Cíle a perspektivy šlechtění brambor ve vztahu k RB

- rychlé *namnožení* cenných genotypů rostlin vytvořených v procesu šlechtění a tím i rychlejší tvorba nových výkonných odrůd
- ozdravení šlechtitelských materiálů od patogenů (zejména původců virových a houbových chorob) a tím zvýšení výnosů a snížení ztrát
- překonání nezkřížitelnosti systematicky vzdálených rostlinných taxonů (druhů, rodů)
- dlouhodobé udržování genetických zdrojů v kultuře *in vitro* a tím podstatné zlevnění a zrychlení šlechtitelského procesu
- možnost indukce vzniku mutantů a polyploidních rostlin a tím získání nových genotypů odrůd v kratším čase
- možnost využití předselekcce v kultuře *in vitro* urychlení a zkvalitnění šlechtitelské práce
- podstatné zkrácení šlechtitelského procesu
- možnost produkce haploidů androgenézí *in vitro*
- rychlejší získávání výchozího šlechtitelského materiálu pro tvorbu nových odrůd
- možnost konstrukce zcela nových genotypů kulturních rostlin – GMO technologie



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin



Brambory

---

## Cíle a perspektivy šlechtění brambor ve vztahu k RB

- produkce *viruprosté* sadby a *in vitro* genová banka
- vytvoření genotypů brambor odolných proti chorobám při zachování všech dalších hospodářsky významných vlastností, indukce a selekce rezistentních (tolerantních) genotypů na úrovni buněčných a protoplastových kultur
- metody indukce haploidů - androgeneze *in vitro*, vzdálená hybridizace (*S. phureja*)



## Využití rostlinných biotechnologií (kultur rostlinných explantátů) ve šlechtění a množení brambor

- rod *Solanum* zahrnuje přes 2000 druhů, 150 z nich tvoří hlízy, 8 z nich se pěstuje (4x 2n, 2x 3n, 1x 4n, 1x 5n), další druhy se využívají ve šlechtění jako donory genů rezistence
- vzhledem k biologii rozmnožování této rostliny a způsobu pěstování lze nalézt nejdůležitější záměry šlechtění a pak i možnosti využití RB:
  - vegetativní rozmnožování - zvýšené nároky na odolnost / toleranci patogenům - virovým chorobám ( Y - čárkovitost, M, X, S, A, virus svinutky ), bakteriálním, houbovým chorobám, háďátku bramborovému
  - způsob pěstování - různé nároky na kvalitativní ukazatele podle způsobu zpracování, plně mechanizovaná výroba brambor - kratší vegetační období, odolnost mechanickému poškození, skládkové choroby



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin



Brambory

---

## Využití rostlinných biotechnologií (kultur rostlinných explantátů) ve šlechtění a množení brambor

- klasické metody šlechtění:
  - křížení - brambor je složitý heterozygot, po křížení se získává velké množství hybridního materiálu, následují výběry, hodnocení materiálu
  - vegetativní způsob rozmnožování umožňuje uchování vlastností a heterozygotních genotypů, vyšlechtění odrůdy trvá cca 15 let



## Využití rostlinných biotechnologií (kultur rostlinných explantátů) ve šlechtění a množení brambor

- prvořadý je význam ozdravování materiálů od původců virových chorob (materiály v novošlechtění i v udržovacím šlechtění) a masové rozmnožení ozdraveného materiálu
- možnost dlouhodobého uchovávání materiálů v podmínkách *in vitro* (meristémová kultura, mikrohlízky, kalus - *in vitro* genová banka)
- využití kultur *in vitro* v rozšiřování genetické variability - výhoda je ve vytváření nových genotypů (s takovou kombinací genů, kterou je složité nebo nemožné získat klasickým křížením), selekce *in vitro*
- GMO



## Ozdravování od chorob – produkce viruprosté sadby

- pomocí meristémových kultur je možné eliminovat původce chorob u *in vitro* regenerované rostliny,
- meristémy (meristemický dóm + 1 - 3 listová primordia) - apikální nebo axilární - se získávají z klíčků nebo stonků - úspěšnost ozdravování a regenerace rostlin ovlivňuje řada faktorů, zejména pak velikost primárního explantátu a charakter patogena,
- meristém je 0.25 mm velký - buňky meristému a nejmladší listová primordia
- viry se vyznačují různým stupněm agresivity a schopností pronikání do meristémů/dělicích se buněk vrcholových meristémů - nejagresivnější (proniká až do vrcholového meristemického dómu je viroid vřetenovitosti hlíz PSTV, po něm následují viry X, M, S - nejméně agresivní, tj. největší neinfikovaná oblast je u virů Y, A, viru svinutky



## Ozdravování od chorob – produkce viruprosté sadby

- pro účinné odstranění agresivních virů/viroidů/příp. dalších patogenů je nutné kombinovat tuto metodu (*in vitro* ozdravování pomocí meristémových kultur) a chemoterapií nebo termoterapií.
- je nutné si také uvědomit, že se snižováním velikosti izolovaného a kultivovaného meristému také klesá schopnost regenerace rostlin
- velikost odebíraného meristému je pak určitým kompromisem - na jedné straně nutnost zachování regenerační schopnosti (zvětšování explantátu) a na druhé straně co možná nejúspěšnější ozdravení - eliminace patogena (zmenšování explantátu)





## Ozdravování od chorob – produkce viruprosté sadby

### *chemoterapie*

- používání chemických látek - k eliminování virů (a jiných patogenů) v meristémových kulturách - benomyl, analogy dusíkatých bází - thiouracil, azadihydrouracil, virazol
- za normálních podmínek (mimo *in vitro* kulturu) tyto látky nemusí mít virostatický účinek - někdy se projevuje fytoxicity těchto látek - zjišťuje se také virostatický účinek i látek běžně obsažených v médiu - 2,4-D, kinetin
- je nutné testovat virostatický účinek chemických látek, jejich toxicitu vůči rostlině/explantátu, posuzovat schopnost regenerace
- nezbytná je detekce přítomnosti/nepřítomnosti virů v regenerovaných rostlinách



## Ozdravování od chorob – produkce viruprosté sadby

### *termoterapie*

- využívá rozdílů v teplotách, při kterých probíhají životní/růstové procesy virů a hostitelských rostlin
- termoterapii (zejména působení zvýšených teplot) se vystavují hlízy, intaktní rostliny nebo rostliny či meristémy kultivované *in vitro*
- při vystavení rostlinného materiálu teplotám 32-39°C po 5 - 10 týdnů dochází ke snížení hladiny těžko odstranitelných virů
- pro eliminování PSTV se používá nízkých teplot 5-10°C



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin

Brambory



# Ozdravování od chorob – produkce viruprosté sadby

## *eliminace bakteriálních chorob (+ mykoplazmóz)*

- těžká detekce patogena
- bakterie i latentně přežívají v rostlině
- používají se metody imunodetekce, metody molekulární biologie pro detekci původců chorob



## System produkce bezvirózní sadby

- 1. ozdravování od viróz - meristémová kultura, doplněná chemoterapií nebo termoterapií regenerace rostlinek
- 2. klonování rostlin v *in vitro* podmínkách - nodální řízky, horizontální kultivace stonků, případně může být doplněno mikrotuberizací *in vitro* namnožení značného množství bezvirózného materiálu
- 3. vysázení do nesterilních podmínek - do skleníků, sítovníků sklizeň bezvirózních hlíz
- 4. polní pěstování a množení bezvirózní sadby celý systém agrotechnických a ochranných opatření k zabezpečení nízké úrovně reinfekce

*Na všech stupních je nutná kontrola zdravotního stavu !*



## Klonování *in vitro*

- meristémové kultury, regenerace rostlinek z kultivovaných meristémů
- **nodální řízky** - méně náročné než meristémy, množitelský koeficient je odrůdově závislý, získává se 3 - 10 nových rostlinek, růst řízků se urychluje přidáním kys.giberelové (GA), NAA
- **horizontální kultivace stonků** (layering) - stonky se umisťují horizontálně na povrch média - potlačení apikální dominance, dochází k prorůstání úžlabních pupenů v nové výhonky, tento postup lze opakovat - za 3 - 4 týdny lze vyrostlý výhonek znovu položit na médium



## Klonování *in vitro*

- **mikrotuberizace** (produkce mikrohlízek *in vitro*) - možnost využití této metody pro množení ozdraveného materiálu, lze využít i dormance hlízek (někdy ale bývá nerovnoměrná) pro vytvoření zásoby materiálu pro vysazování do polních podmínek, při výsadbě není také tak velké % napadení chorobami
- mikrotuberizace se dociluje stimulací regenerovaných rostlin, n. rostlin vyrostlých z řízků *in vitro* kultivovaných na MS médiu
- rostliny se přelijí tekutým médiem s vysokým obsahem sacharózy (sacharóza a BAP stimuluje tuberizaci), rostliny se přemístí do tmy, po 3 měsících rostliny zasychají a sklízí se hlízky



## Klonování *in vitro*

- tvorba adventivních výhonků:
  - tvorba na kultivovaném meristému *in vitro* - regenerace značného množství prýtů (rostlinek)
- tvorba adventivních pupenů (také přes kalus) na listových explantátech
  - u odrůdy Desireé - ačkoli se v těchto případech nezjistil žádný výskyt fenotypových nebo genotypových odchylek, upustilo se od využívání této techniky pro účely klonování bramboru *in vitro* - z důvodu možnosti vzniku spontánních mutací a zvýšení genetické variability.



## Dlouhodobé uchovávání materiálu *in vitro*

- uchovávání genových zdrojů, výchozích materiálů pro šlechtění v *in vitro* podmínkách - ochrana proti reinfekci virovými chorobami, malé nároky na uskladňování, možnost výměny materiálu (bez karantény, bez problému s vegetační dobou - J.Amer./Evropa)
- kultivace na minimálním médiu - prodlužování subkultivační periody, není to ale příliš vhodný způsob, negativně se projevuje nízké % přežívání rostlin
- kultivace na médiích s přidavkem retardantů růstu - zkrácení internodií, některé látky (CCC) mají i vliv na tvorbu hlízek - značně se prodlužuje přežívání kultury
- kultivace při snížených teplotách - prodloužení subkultivační periody při teplotách do 10°C + krátký den, tvorba mikrohlízek (ty lze při teplotě 2-4°C udržovat až 1 rok - kryoprezervace)
- uchovávání při teplotách -10 - -15°C (vlivem kryoprotektiv nedochází ke zmrznutí cytoplasmy), i metoda zmrazování v kapalném dusíku - stonkové vrcholy, meristémy, možnost uchovávání materiálu po neomezenou dobu





## Techniky rozšiřující genetickou variabilitu

### Indukce tvorby haploidů

- převážně se postupuje cestou androgeneze
- zatím neznámé faktory určují další vývoj mikrospor:
  - normální pylové zrno
  - pylové embryoidy
  - pylový kalus
- jev je genotypově závislý, některé materiály nesou znak zvýšené androgenní schopnosti
- využití androgeneze *in vitro* je zejména v získávání monoploidních rostlin



# Techniky rozšiřující genetickou variabilitu

## Indukce tvorby haploidů

- diploidní materiál ( $2n$ ) se získává využitím techniky indukované partenogeneze po křížení *S.tuberosum* x *S.phurea*
- monoploidní rostliny - se získávají androgenézí *in vitro*
- výběr recesivních mutantů, mapování genotypu ...
- produkce homozygotů  $2n$ ,  $4n$
- v tomto případě by bylo možné i množení semeny
- obnovení tetraploidního počtu chromozómů je možno kolchicinací, nebo regenerací z kalusů
- objevila se i myšlenka vyšlechtění  $n$ . výběru monoploidních linií s různými rezistencemi a pak jejich složení do  $4n$  rostliny (fúze protoplastů a křížení  $2n$  rostlin)



## Techniky rozšiřující genetickou variabilitu

### Regenerace mutantů z nodálních řízků a izolovaných pupenů

- působení gama záření na rostliny - *in vitro* regenerace rostlin, zjišťování výskytu mutantů (tímto způsobem se získává větší podíl chimér)
- kalusové kultury:
  - regenerace rostlin je závislá na genotypu, ale i na vyváženosti růstových regulátorů v médiu. Zjišťování variability v charakteru natě, tvaru hlíz, zbarvení šlupky a dužiny hlíz, obsahu škrobu, cukrů, odolnosti plísni.
- selekce *in vitro*:
  - cílem je zefektivnění výběru regenerantů se žádoucími znaky a vlastnostmi.
  - selekce na zvýšenou rezistenci chorobám - přidávání filtrátu z plísně bramborové do média - získání regenerantů odolnějších plísni, pozornost se věnuje i selekci na odolnost fuzariózám, toleranci virovým chorobám, mokré hnilobě
  - selekce *in vitro* může probíhat na úrovni kultivace kalusu nebo i buněčné suspenze - suspenzní kultury se využívají pro selekci mutantů odolnějších stresovým faktorům, zvýšenému zastoupení esenciálních aminokyselin, s větší odolností mrazům, zasolení, herdicidům -- zatím se podařilo získat jen buněčné linie, ne regeneranty



## VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD POTATO RESEARCH INSTITUTE

[\[Zpět\]](#) [\[Úvodní stránka\]](#) [\[Aktuality\]](#) [\[Věe o nás\]](#) [\[Služby\]](#) [\[Vedecké práce\]](#) [\[Publikace\]](#) [\[Knihovna\]](#)

### Oddělení tkánových kultur

Činnost oddělení tkánových kultur je zaměřena na rozvoj a využívání poznatku na úseku explantačních technik u bramboru.

Vedoucí: Ing. Vendulka Horáková, CSc.  
Odborní pracovníci: Ing. Marie Greplová,  
Jitka Zášková, Marta Žáková

#### Co děláme:

- řešíme část projektu "Národní program konzervace a využití genofondu rostlin", která se týká shromažďování a uchování genetických zdrojů bramboru v kultuře in vitro a jejich poskytování pro vědecké a šlechtitelské účely
- v rámci projektu NAZV MZe CR výzkumne řešíme problematiku obsahu glykoalkaloidů u bramborů z hlediska šlechtitelského
- v rámci projektu NAZV MZe CR výzkumne řešíme problematiku výskytu somatické variability u meristémových klonů po aktivním ozdravování od virů
- v rámci programu COST (Evropská spolupráce ve vědeckém a technickém výzkumu) řešíme problematiku somatické hybridizace u bramboru. Projekt je podporovaný MŠMT
- provádíme aktivní ozdravování bramboru od virových chorob pomocí izolace meristému po termoterapii a pomocí virostatických preparátů



#### Co nabízíme:

- množení materiálu z banky in vitro pro šlechtění a výzkum
- převody, udržování a ozdravování od virových chorob
- dlouhodobé udržování šlechtitelských a výzkumných materiálů ve fremních a výzkumných kolekcích



Kontaktní adresa:  
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o.  
Dobrovského 2366  
580 01 Havlíčkův Brod  
tel.: 569 466 220, fax: 569 421 578  
E-mail: [horakova@vubhb.cz](mailto:horakova@vubhb.cz)



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



## Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin

### Brambory

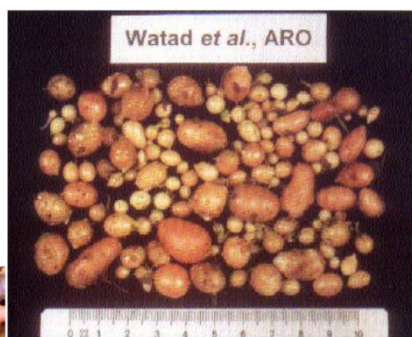


Fig. 5: Representative harvest of a Group 1 raft.