



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

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



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

- Objevy učiněné v posledním období nejprve v **buněčné biologii** a později v **molekulární biologii** měly velký vliv na rozvoj celého komplexu nových metod a technik, obecně nazývaných **rostlinné biotechnologie**.
- Termín rostlinné biotechnologie je (nebo byl) velmi často používán ve smyslu určitého zaklínadla. Mnohdy došlo k přecenění možností, které RB nabízely nebo umožňovaly, RB se tak dostaly do role určitého „všeléku“ na mnohé problémy zemědělství (šlechtění rostlin, kombinace vhodných znaků až konstrukce nových komplexů vlastností, překonání nevhodných pěstitelských podmínek, zpracování rostlinných produktů a odpadů z výroby...). Před RB byly tak postaveny nereálné cíle a komplex biotechnologických metod se naopak postupem času začal neprávem zavrňovat.
- Jedna ze součástí RB jsou „**kultury rostlinných explantátů *in vitro***“, t.j. aseptická kultivace izolovaných částí rostlin za umělých podmínek, a další s tím související techniky - metody **transformace rostlin, GI, imobilizace rostlinných buněk**.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

**Fyziologie a genetica rostlinných
explantátových kultur**

Využití v genetice a šlechtění



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

- Na počátku rozvoje RB, když se objevily jejich nové možnosti, se do nich kladly velké naděje a finanční prostředky. Postupem času pak počáteční nadšení a euforie poněkud opadla, objevily se mnohé problémy - zejména v aplikaci laboratorních experimentů do praxe. Nyní se vypracovávají střízlivější projekty a RB se příkládá ve světě stále velký význam. Nicméně rychlý rozvoj biotechnologických metod ale nijak nesnižuje význam klasických šlechtitelských metod.



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

- **Tradiční - klasické šlechtitelské metody** jsou primárně založeny na kombinování zajímavých znaků a lastností po křížení rodičovských rostlin. Tento přístup má ale několik omezení - ***intra-*** a ***interdruhovou kompatibilitu***, (resp. inkompatibilitu) možnou ***nestabilitu*** nových kombinací genů během množení získaných genotypů a poměrně ***dlouhou dobu rozmnožovacího cyklu***. Šlechtitelský selekční program, v závislosti na druhu rostliny, zahrnuje 5 - 15 cyklů pohlavního rozmnožování. Zkrácení doby šlechtění je možné při pěstování některých generací ve sklenicích, nebo střídavým pěstováním na severní a jižní polokouli. U vytrvalých rostlin, či dřevin, které se pohlavně mohou rozmnožovat až po několika letech, je tento problém ještě výraznější. Těmito tradičními metodami také není možné kombinovat geny praktického významu ze dvou inkompatibilních rostlin. Zcela nemožné je získání rostlin s geny pocházejícími z nerostlinných zdrojů (mikroorganismů - *např. rezistence vůči herbicidům, hmyzu; živočichů - geny pro luciferázu...*). Například vnesení genu kódující patatin, bílkovinu brambor s vynikající nutriční hodnotou, do druhů produkujících velké množství bílkovin - sója, kukuřice - je nemožné při používání konvenčních šlechtitelských metod.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Fyziologie a genetik a rostlinných
explantátových kultur



Využití v genetice a šlechtění

Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

- **Kompatibilita** (resp. inkompatibilita), **stabilita** a **délka šlechtitelského cyklu** jsou 3 nejdůležitější faktory limitující účinnost konvenčního šlechtění. Jakýkoli postup, který **zcela** nebo jen **částečně překonává tato omezení**, představuje **pokrok v oblasti šlechtění rostlin**.

Z tohoto pohledu mají biotechnologie tři základní praktické dopady:

- zvýšení genetické variability jiným způsobem než pohlavním rozmnožováním
- množení genotypů, které jsou nestabilní při pohlavním rozmnožování
- snížení počtu nebo délky šlechtitelských cyklů potřebných v selekčním programu.



Historický vývoj rostlinných biotechnologií

Výzkum		Praktické použití
Přímý přenos DNA do intaktní rostliny	1986	Nová odrůda zelí jako produkt fúze protoplastů
Expres cizího genu kódujícího „užitečnou“ vlastnost v rostlině	1985	Nová odrůda pšenice vytvořená haploidní technikou (F)
Přímý přenos DNA do rostlinného protoplastu	1984	Patentování rostlinného genu (USA)
Expres cizího genu v rostlině	1983	Patentování umělých semen
	1979	Patent - imobilizace rostlinných buněk (FRG)
	1975	Nová odrůda rýže (Čína) a tabáku (Japonsko) - haploidní technika
Integrace Ti plasmidu do rostlinného genomu	1974	
Regenerace rostliny z produktu fúze protoplastů	1972	
Kryoprezervace rostlinné buněčné suspenze	1968	Vytvoření první komerční společnosti - produkce rostlin vegetativní propagací <i>in vitro</i>
Haploidní rostlina regenerovaná z prašnickové kultury	1964	
Izolace protoplastů enzymatickou metodou	1960	
Regenerace celistvé rostliny somatickou embryogenezi	1958	
	1955	Patent na bioreaktor - rostlinná buněčná kultura (USA)
Buněčná suspenze v tekutém médiu	1954	Počátek využívání meristémových kultur - produkce bezvirózních rostlin
Bezvirózní rostlina odvozená z meristémové kultury	1952	
Zjištění absence virů v meristematických strukturách	1949	
Regenerace celistvé rostliny z apikální struktury	1946	
Neomezený růst neorganizované rostlinné tkáně	1939	
První pravá rostlinná tkáňová kultura	1934	
Buněčná teorie	1838 Sumerové, Antické Řecko..... -regenerace



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Fyziologie a genetik a rostlinných
explantátových kultur

Využití v genetice a šlechtění



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

V současné době je hlavní pozornost věnována následujícím oblastem:

- 1. - *propagace rostlinného materiálu = in vitro klonování*
- 2. - *produkce bezvirózních rostlin*
- 3. - *embryokultury*
- 4. - *indukce tvorby haploidů*
- 5. - *selekce a mutageneze in vitro*
- 6. - *produkce sekundárních metabolitů*
- 7. - *somatická hybridizace fúze protoplastů*
- 8. - *přenos, stabilní integrace a exprese určitých genů v kulturních rostlinách (GMO/GMP).*



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Fyziologie a genetik a rostlinných
explantátových kultur



Využití v genetice a šlechtění

Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin 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)
- vyšlechtění nových genotypů *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



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Fyziologie a genetik a rostlinných
explantátových kultur

Využití v genetice a šlechtění



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin ve vztahu k RB:

- možnost využití *předselekce* v kultuře *in vitro* urychlení a zkvalitnění šlechtitelské práce
- získání nových a udržení existujících genotypů *s pylovou sterilitou*
- podstatné *zkrácení* šlechtitelského procesu
- možnost produkce *haploidů* androgenezí a gynogenezí *in vitro*
- rychlejší získávání výchozího šlechtitelského materiálu pro tvorbu nových odrůd
- možnost konstrukce zcela *nových genotypů* kulturních rostlin
- umělé sestavování žádoucích znaků a vlastností *při využití metod GI*



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin ve vztahu k RB:

- Předpokladem využití těchto biotechnologických metod ve šlechtění a semenářství a množení rostlin předpokládá existenci *spolehlivě fungujících*, dobře *rozpracovaných* metod *kultivace, propagace a regenerace rostlin in vitro*. Metod, které budou „fungovat“ u široké škály genotypů (zde je právě velký problém, protože ne všechny genotypy daného druhu nebo odrůdy reagují stejně a při mnohých manipulacích *in vitro* se projevuje silná genotypová závislost).
- Dalším předpokladem pro širší zavedení těchto metod je i materiálně technické vybavení na odpovídající úrovni a kvalitní personální obsazení. Také je nutná úzká spolupráce mezi biotechnologií, genetikou a šlechtiteli - kteří jsou často spíše konkurenty a soupeři než spolupracovníci. Mnoho programů ztroskotává na tom, že výsledky biotechnologických manipulací (*in vitro* regenerované rostliny, získané somaklony ...) nejsou začleňovány do šlechtitelských programů.



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin ve vztahu k RB:

- Explantátové kultury se poměrně široce uplatňují zejména v množení okrasných rostlin a dřevin (pokojoyých i zahradních), produkce rostlin z TK je např. v NL udávána na několik stovek miliónů rostlin ročně. V poněkud menší míře (i menší než se očekávalo) se TK uplatňují při novošlechtění polních a zahradních plodin, a v systémech udržovacího šlechtění - zejména vegetativně množných druhů.
- V sedmdesátých letech byla vytvořena i koncepce tzv. *explantátového šlechtění* - tj. program využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* ve šlechtění. Explantátové šlechtění bylo definováno jako šlechtitelská metoda, při níž se na konečném výsledku (šlechtitelském produktu) významnou měrou podílí kultura explantátů *in vitro*.
- Nyní jsou kultury rostlinných explantátů a i metody molekulární biologie považovány spíše za pomocné metody, které *napomáhají urychlovat a zkvalitňovat šlechtitelský proces*.



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Předpoklady uplatnění metod explantátových kultur, metod GI u jednotlivých plodin jsou následující:

- *pšenice* - využití haploidů je neúčinnější a nejrychlejší cestou získávání vyrovnaných homozygotních linií u pšenice, v *in vitro* kultuře je možno navodit i rozsáhlou genetickou variabilitu - získané somaklony pšenice mohou být využity jako výchozí šlechtitelský materiál
- *ječmen* - tvorba linií u ječmene je možná využitím metody androgeneze *in vitro* nebo indukci haploidů po křížení s *Hordeum bulbosum*. Výtěžnost haploidů při využití obou metod udávají někteří autoři jako přibližně stejnou
- *kukuřice* - využití androgeneze *in vitro* pro získávání haploidů - tvorba homozygotních linií u kukuřice. U šlechtitelsky významných linií (i získaných klasickým způsobem) se objevuje možnost využití somatické embryogeneze pro rychlé namnožení identického materiálu



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Předpoklady uplatnění metod explantátových kultur, metod GI u jednotlivých plodin jsou následující:

- *luskoviny* - vypracování metod selekce *in vitro* (rezistence k chorobám a stresovým faktorům, změna složení zásobních proteinů), metody GI - zásobní proteiny, vypracování metod androgeneze a gynogeneze *in vitro*, metod SE - množení geneticky a šlechtitelsky cenných materiálů
- *řepka olejka* - využívají se metody androgeneze *in vitro* pro tvorbu homozygotních (izogenních) linií, sekundární SE pro rychlé namnožení vybraných genotypů, vypracování metod selekce *in vitro* na buněčné úrovni a manipulace s protoplasty - odolnost chorobám, změna spektra mastných kyselin, barva o semení...



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Fyziologie a genetik a rostlinných
explantátových kultur

Využití v genetice a šlechtění



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Předpoklady uplatnění metod explantátových kultur, metod GI u jednotlivých plodin jsou následující:

- *len* - vypracování systémů regenerace *in vitro*, metody SE, selekce na buněčné úrovni
- *brambory* - 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*)
- *cukrovka* - metody mikropropagace *in vitro*, indukce haploidů a tvorby homozygotních linií, rozšíření genetické variability



Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění rostlin

Předpoklady uplatnění metod explantátových kultur, metod GI u jednotlivých plodin jsou následující:

- *jeteloviny* - metody mikropropagace a ozdravování *in vitro*, SE - množení cenných genotypů elitních rostlin, protoplastové kultury - SE, metody GI - přenos cizorodé DNA, selekce *in vitro* - rezistence patogenům, herbicidům, stresům, vzdálená hybridizace - metody embryokultur
- *pícní trávy* - tvorba výchozího šlechtitelského materiálu po mezirodovém a mezidruhovém křížení - využití metod embryokultur, metody polyploidie *in vitro*, SE, mikropropagace a ozdravování *in vitro*
- *ovoce* - produkce bezvirózních rostlin u jahodníku, ovocných dřevin, drobného ovoce, mikropropagace *in vitro*
- *zelenina* - využití haploidů pro tvorbu homozygotních linií (androgenezí - u papriky, mrkve, brukvovité zeleniny, gynogenezí u cibule), mikropropagace materiálu po křížení, embryokultury, produkce bezvirózních rostlin a rozšiřování genetické variability u česneku