

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

1 evidenčné číslo

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

**VYUŽITIE *IN VITRO* TECHNÍK V ŠĽACHTENÍ A
MNOŽENÍ STRUKOVÍN**

Rok predloženia 2010

Michaela Biháriová

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**VYUŽITIE *IN VITRO* TECHNÍK V ŠĽACHTENÍ A
MNOŽENÍ STRUKOVÍN**

Bakalárska práca

Študijný program:	Agrobiotechnológie
Školiace pracovisko:	Katedra genetiky a šľachtenia rastlín
Školiteľ:	Ing. Jana Kutišová

Nitra 2010

Michaela Biháriová

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Michaela Biháriová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Využitie techník *in vitro* v šľachtení a množení strukovín“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej kultúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Hlohovci 17. mája 2010

.....

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela vyjadriť pod'akovanie vedúcej bakalárskej práce Ing. Jane Kutišovej za pomoc, odborné rady a usmerňovanie pri spracovaní celej práce.

Zoznam použitých skratiek

2,4-D	kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
ABA	kyselina abscisová
a kol.	A kolektív
BAP	benzyl aminopurín
CaCl ₂ · 2H ₂ O	dihydrát chloridu vápenatého
CaCl ₂ · 6H ₂ O	hexahydrát chloridu vápenatého
CuSO ₄ · 5H ₂ O	pentahydrát síranu meďnatého
EK	explantátové kultúry
g	gram
GA3	kyselina gibereľová
GMR	geneticky modifikované rastliny
H ₃ BO ₃	kyselina boritá
IAA	kyselina β-indolyloctová
IBA	kyselina indolyl-3- masľová
kg	kilogram
KH ₂ PO ₄	dihydrofosforečnan draselný
KIN	kinetín
KI	jodid draselný
KNO ₃	dusičnan draselný
kPa	kilo Pascal
MgSO ₄ · 7H ₂ O	heptahydrát síranu horečnatého
ml	mililitr
mm	milimeter
mmol/l	milimol na liter
MnSO ₄ · 4H ₂ O	terahydrát síranu manganatého
mol/m ² · s ⁻¹	mol na meter štvorcový na sekundu
NAA	kyselina α naftyloctová
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	dihydrát manganistanu sodného

NH_4NO_3	dusičnan amónny
N-látky	dusíkaté látky
O_2	molekula kyslíku
pH	сила водíка
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinočnatého

Abstrakt

Strukoviny považujeme v našich podmienkach za kvalitné a vo veľkej miere pestované plodiny, pretože majú vhodnú bielkovinovú a nutričnú skladbu. Šľachtením a používaním biotechnologických metód sa ich vlastnosti dajú ešte vylepšiť. Tieto metódy súvisia s odoberaním rôznych častí rastliny a ich následným kultivovaním na živných pôdach. Podľa druhu metódy sa z týchto častí získavajú geneticky variabilné alebo geneticky rovnaké jedince. Tie sú základom pre ďalšie spracovanie a následné využívanie strukovín v poľnohospodárskom a potravinárskom priemysle (Biháriová, 2010).

Kľúčové slová: biotechnologické metódy, strukoviny, šľachtenie, kultivácia *in vitro*

Abstract

In our conditions we consider pulse as high quality and widely grown crops, because they have adequate protein and nutritional composition. With use of breeding and biotechnological methods, their properties can still be improved. These methods are related to procurement of various parts of the plants and then cultivated on nutrient soils. The other method of receiving these parts genetically variable or genetically identical individuals. They are the basis for further processing and subsequent use of legumes in agriculture and food industry (Biháriová, 2010).

Kľúčové slová: biotechnologické metódy, strukoviny, šľachtenie, kultivácia *in vitro*

Obsah

1	Úvod	10-11
2	Cieľ práce	12
3	Metodika práce	13
4	Súčasn \acute{e} riešenie problematiky	14-35
4.1	Botanická charakteristika strukovín	14
4.2	Chemické zloženie semien strukovín	15
4.3	Rast a vývoj strukovín	16
4.3.1	Klíčenie semien strukovín	16
4.3.2	Vývoj strukovín	16
4.4	Technológia pestovania	17
4.4.1	Hrach siaty	17
4.4.2	Sója fazuľová	17
4.4.3	Bôb obyčajný	17
4.5	Biotechnologické metódy	18-22
4.5.1	Embryokultúry	18-19
4.5.2	Meristémové kultúry	19-20
4.5.3	Peľové a peľnicové kultúry	20
4.5.4	Kalusové kultúry	20
4.5.5	Bunkové kultúry	21
4.5.6	Protoplastové kultúry	21
4.5.7	Mikropropagácia <i>in vitro</i>	22
4.6	<i>In vitro</i> techniky využívané pri šľachtení strukovín	23-26
4.6.1	Hrach	23
4.6.1.1	Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia <i>in vitro</i>	23
4.6.1.2	Embryokultúry	24
4.6.1.3	Protoplastové kultúry	24
4.6.1.4	Kalusové kultúry	24

4.6.2	Sója	25
4.6.2.1	Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia <i>in vitro</i>	25
4.6.2.2	Embryokultúry	25
4.6.2.3	Protoplastové	26
4.6.2.4	Oplodnenie <i>in vitro</i>	26
4.6.3	Bôb	26
4.6.3.1	Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia <i>in vitro</i>	27
4.6.3.2	Peľové a peľnicové kultúry	27
4.6.3.3	Kalusové a suspenzné kultúry	27
4.6.3.4	Protoplastové kultúry	27
4.6.4	Ostatné strukoviny	28
4.7	Podmienky kultivácie	29-31
4.7.1	Vonkajšie faktory	29-30
4.7.2	Vnútorne faktory	31
4.8	Kultivačné médiá	32-33
4.9	Založenie embryokultúry hrachu siateho	34-35
5	Záver	36-38
6	Zoznam použitej literatúry	39-40

Úvod

Využitie *in vitro* kultúr, tzv. explantátových kultúr, ako metódy množenia a šľachtenia rastlín má veľký hospodársky význam pretože sa ním dosiahla regenerácia celých rastlín, doplnili sa techniky ozdravovania rastlinného materiálu od patogénov.

Metóda *in vitro* kultivácie umožňuje rast izolovaných častí rastliny – primárneho explantátu v presne definovaných podmienkach kultivačného média. Kultivuje sa v sterilnom prostredí za regulovaných fyzikálnych podmienok ako sú teplota, svetlo, pH kultivačného média, typ kultivačnej nádoby a i.

Za posledné desaťročie sa vytvorili zásadné podmienky na využívanie explantátových kultúr ako novej metódy množenia a šľachtenia rastlín. Tieto techniky sa doplnili aj o ďalšie, ktoré umožňujú riešenie problémov v oblastiach mikropropagácie rastlín, ozdravovania rastlinného materiálu od patogénov, netradičných šľachtiteľských metód, otázok cytologických procesov, morfológie a patológie pletív a je nedeliteľnou súčasťou génových bánk.

Tieto techniky môžu byť využité na masovú produkciu rastlín pri zachovaní nezmeneného rastlinného genómu. Z toho vyplýva, že rastlina bude mať presne tie isté charakteristické vlastnosti ako mala materská rastlina. Na druhej strane môžeme využitím týchto techník získať vyššiu plasticitu rastlinného genómu, ako napríklad vyššia tolerancia voči biotickým alebo abiotickým faktorom, odolnosť voči vysokým koncentráciám solí v pôde a i.

Metódy *in vitro* kultivácie majú v dnešnej dobe využitie hlavne v šľachtiteľskom a semenárskom procese, kde sa dosahuje predovšetkým:

- rýchle rozmnožovanie cenných rastlinných genotypov vzniknutých šľachtiteľskou činnosťou, tým rýchlejšia tvorba nových výkonných odrôd,
- ozdravovanie rastlinných materiálov od patogénov, najmä od vírusov a tým dosiahnutie vyšších úrod a nižších strát,
- prekonanie nekrížiteľnosti systematicky vzdialených rastlinných taxónov,
- dlhodobé udržiavanie genetických zdrojov v kultúre *in vitro* a tým podstatné zlacnenie a zrýchlenie šľachtiteľského procesu,
- indukciu vzniku haploidných a polyploidných organizmov využitím premenlivosti rastlinných pletív a získania nových odrôd poľnohospodárskych a okrasných plodín v kratšom čase,

- konštrukciu nových genotypov kultúrnych rastlín. (Seman a kol. 1990)

Kolísanie úrod strukovín je jedným z dôvodov, ktorý bráni ich rozširovaniu na ďalšie plochy. Pretože ich vegetačné obdobia súvisia od poveternostných podmienok. Rozhodujúce sú teplotné a vlhové podmienky vo fáze kvitnutia a tvorby strukov. Ak sa vyskytne v tomto období nedostatok zrážok, výška úrody je ohrozená. Z tohto dôvodu používame závlahový systém. A naopak v období dozrievania je potrebné teplé a suché počasie. Medzi agronomické faktory, ktoré ovplyvňujú stabilitu úrody strukovín patria, odroda, výživa, hnojenie, zber bez poškodenia semien. Úrodovú neistotu spôsobujú dlhé obdobie kvitnutia a zrenia, náchylnosť na poliehanie a choroby, napadnutie škodcami, pukavosť strukov, poškodenie semien pri mlátení. (Karabínová a kol. 1998)

Všetky tieto faktory sa dajú vhodými *in vitro* technológiami buď potlačiť alebo stimulovať v náš prospech.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom zadanej práce je spracovanie odbornej literatúry a vyhodnotenie techník explantátových kultúr pri množení a šľachtení strukovín v podmienkach *in vitro*. Prácou by som vám chcela priblížiť techniky *in vitro*, ktorými vylepšujeme a zvyšujeme genetickú variabilitu plodín a následne ich zmnoženie.

3 METODIKA PRÁCE

Na vypracovanie zadanej práce som zvolila postup:

- Hromadenie materiálov

Používala som literatúru domácu, zahraničnú a internetové stránky.

- Oboznámenie sa s problematikou

Študovanie materiálov o problematike a jej riešení.

- Spracovanie

Poznatky a informácie z použitých zdrojov som spracovala formou kompilačnej práce.

4 SÚČASNÉ RIEŠENIE PROBLEMATIKY

4.1 Botanická charakteristika strukovín

Strukoviny zaraďujeme do čeľade *Fabacea*, v našich podmienkach majú hospodársky význam tieto rody a druhy:

Rod: *Pisum sativum subsp. Arvense* – hrach siaty, *Vicia sativa*- Vika siata, *Lens esculenta*- šošovica jedlá, *Glycine max*- sója fazuľová, *Faba vulgaris*- bôb obyčajný konský a i.

Listy majú najčastejšie perovito (vika) alebo dlaňovito (ďatelina) zložené, zriedkavo jednoduché (kručinka). Prílistky sú trváce, veľké a nápadné má hrach u agátu sú premenené na tŕne. Perovito zložené listy môžu byť ukončené úponkou (hrach) alebo hrotom (hrachor). Súkvetie bôbových rastlín je stravec alebo hlávka. Kvety súmerné typickej stavby s charakteristickým C lupienkom. Horný C lupienok je striedka *vexillum*, ktorý môže smerovať dopredu alebo je naspäť ohnutý. Dva bočné lupene sú voľné a tvoria krídla *alae*, dolné sú zrastené a tvoria člnok *carina*. V člnku sú tyčinky a jednoplodolistý piestik. Plodom je rôzne tvarovaný struk spravidla pukavý alebo priečne zaškrcovaný pastruk. Semená v struku často v počte 1-4 s obsahom oleja, ale aj bielkovín. Významnou črtou semien je tvrdosť.

Pre bôbovité rastliny je charakteristická symbióza s nitrogénymi baktériami, ktoré viažu vzdušný dusík a premieňajú ho na dusičnany. Na koreňoch rastlín sa po vzídení začínajú tvoriť hrčky, ktoré sa tvoria po infekcii koreňovej sústavy hrčkotvornými baktériami rodu *Rhizobium*. Baktéria je schopná viazať vzdušný kyslík. Tento vzťah nazývame symbióza. Hostiteľská rastlina využíva dusík ako náhradu energetický zdroj vo forme cukru (Karabínová , 1998).

Sú to hlavne byliny a v menšej miere dreviny, využívané ako krmoviny (ďatelina, lucerna), olejniný (sója), medonosné (agát, komorica) a liečivé rastliny (agát, bôľhoj).

Poznáme aj jedovaté druhy (štedrec, lupína) ale aj okrasné najmä agáty. (Baranec a kol. 2004)

4.2 Chemické zloženie semien strukovín

Tab. 1 Obsah jednotlivých zložiek semien strukovín

Plodina	N- Látky	Tuk	Bezdušik. l.	Vláknina	Popoloviny
Hrach siaty	23,4	1,8	52,6	5,5	2,8
Fazuľa poľná	23,6	1,9	55,6	3,9	3,6
Bôb obyčajný	25,4	1,5	48,5	7,1	3,2
Šošovica jedlá	25,5	1,9	52	3,4	3
Vika siata	26	1,7	49,8	6	3,2
Sója fazuľová	33,2	17,5	30,2	4,4	4,7

Tab. 2 Plochy a úrody strukovín v roku 1993

Druh	Výmera v hektároch	Úroda v ha na tonu
Jedlé strukoviny	62763	1,89
Hrach	59424	1,93
Šošovica	1356	1,03
Fazuľa	1983	1,33
Strukoviny krmne	3508	1,83
Bôb	1144	1,31
Strukoviny spolu	66271	1,88

4.3 Rast a vývoj strukovín

4.3.1 Klíčenie semien strukovín

Čas pri nedostatku vody v prostredí a nižšej teplote sa predlžuje. Pri napučíavaní sú schopné prijať 75 -140% vody z ich hmotnosti. Z týchto dôvodov sadíme strukoviny hlbšie do pôdy. Najvyššia rýchlosť klíčenia sa pohybuje pri teplote 18 – 20°C.

Podľa ekologických podmienok vschádzanie trvá 8 až 20 dní. Obdobie pomalého rastu trvá od spotrebovania dusíka zo semien do rozvoja korieňkov. Toto hladové obdobie sa dá prekonať hnojením.

Ďalšie obdobie je charakteristické ako fáza hlavného rastu. Zakladajú sa kvety, kvitnú

kvety a tvoria sa plody. Kvitnutie prebieha v rastline zhora nahor.

V zelenej fáze zrelosti sú listy a struky zelené, semená v struku mäkké.

Žltá zrelosť je typická žltnutím rastliny, semená tuhnú, tvrdnú a typicky sa vyfarbujú.

Vo fáze plnej zrelosti schnú a opadávajú listy, pukavé struky puknú a semená sú tvrdé (Karabínová, 1998).

4.3.2 Vývoj strukovín

Pri ozimných druhoch nie je taký výrazný ako u obilnín. Všetky ozimné druhy kvitnú na jar. Jarné druhy majú široké rozmedzie teplôt s rovnakým účinkom na priebeh jarovizácie (Karabínová, 1998).

4.4 Technológia pestovania

4.4.1 Hrach siaty

V rámci osevu sa vysádza po obilninách. Na jednom poli ho možno pestovať až o ďalších 4-6 rokov. Pôdu pripravíme jesennou orbou, urovnáním, jarným smykovaním, bránením a kyprením. Hnojíme na jeseň fosforečnými alebo draselnými hnojivami. Odporúčané dávky sú 24-40 kg dusíkatých, 8 kg fosforečných, 35 kg draselných a 24 kg vápenatých. Sejba – šírka medziriadkov je 125- 300mm a počet semien na 1m² od 80 do 125. Hĺbka sejby je 50- 70mm. Osivo moríme. Ochrana porastu proti burinám, vírusovým ochoreniam, hubám a škodcom je potrebná počas celého vegetačného obdobia. Zberu hrachu na semeno sa uskutočňuje priamym zberom pomocou kombajnov pri 18-22% vlhkosti. Zeleno semenné odrody 20-25%, krmny hrach 35-40% (Karabínová, 1998).

4.4.2 Sója fazuľová

Najvhodnejšia predplodina sa používajú okopaniny. Pôdu pripravíme jesennou orbou, urovnáním, jarným smykovaním, bránením a prekyprením. Hnojíme vyššími dávkami dusíkatých hnojív 60-150 kg, 20-40 kg fosforečných a 70-120 kg draselných. Sóju sejeme v 250-400mm rozostupoch. Sejeme často aj v dvojradoch. Hĺbka sejby je 40-

60 mm. Výsev semien 100-140kg na hektár. Po sejbe pôdu zvalcujeme a ak treba zavlažujeme. Na sóji sú časté vírusové choroby- mozaika, kučeravosť. Hubové choroby a tiež bakteriálne ochorenia či škodcovia (Karabínová, 1998).

4.4.3 Bôb obyčajný

Sejba je čo najsôr na jar (polovica marca). Pripravenie pôdy na jeseň zahŕňa orbu do 25cm hĺbky, prekypanie 80-100mm a je dôležité minimálne smykovanie aj ďalšie operácie. Aplikujeme hnojivá fosforečné 40kg, draselné až 80kg a pri dusíkatých hnojivách maximálne 20kg na hektár. Rozostupy riadkov sa pohybujú od 150 do 250mm, pričom hĺbka riadku je 60-80mm. Výsevok bôbových semien je rozdielny od vlhkosti pôdy. Pri suchších pôdach musíme vysiať väčšie množstvo, aby bola dobrá úroda, až 300kg osiva. Pre vlhké pôdy stačí menej a to 250kg osiva na hektár. Po sejbe pôdu povalcujeme. Pred chorobami, škodcami a burinami porasty bôbu ošetrujeme chemickými látkami.

4.5 Biotechnologické metódy

Rozdelenie explantátových kultúr môže byť z viacerých hľadísk.

Delenie podľa typu východiskového explantátu:

- orgánové kultúry- explantátom je diferencovaný orgán

Embryokultúry

Peľnicové kultúry

Kultúra izolovaných koreňov

- Pletivové kultúry- explantát je časť somatického pletiva

Meristémové kultúry

Iné pletivá

- Bunkové kultúry -východiskový materiál je izolovaná bunka
- Protoplastové kultúry- východiskovým materiálom je bunka zbavená bunkovej steny

Delenie podľa schopnosti zachovania genetickej stability explantátovej kultúry:

- Zachovávajúce relatívnu genetickú stabilitu

Embryokultúry

Meristémové kultúry

Mikropropagácia

- Explantátové kultúry rozširujúce genetickú variabilitu:

Kalusové kultúry

Bunkové kultúry

Protoplastové kultúry

4.5.1 Embryokultúry

Cieľom je získanie životaschopného organizmu z embrya. Zrelého alebo nezrelého. Primárnym explantátom je Embryo vznikajúce zo zygoty, ktoré tvorí základ novej rastliny zo základmi púčika, koreňa na kľúčnych listov.

Embryokultúru zakladáme zo zrelých alebo nezrelých embryí tzv. proembryí. Nezrelé majú viaceré vývinové štádiá – Globulárne, srdcovité, torpédovité a pre rast potrebujú okrem základných látok kultivačného média aj vitamíny, aminokyseliny, regulátory rastu a zvýšenú koncentráciu sacharózy (8-12%). Táto spôsobuje podobné osmotické podmienky ako sa vytvárajú pri raste embrya v zárodočnom miešku. Dva týžne rastú na živnej pôde a prenášané sú na médium s vyššou koncentráciou sacharózy a rastovými regulátormi, ktoré navodia rast embrya a tvorbu výhonkov. Ak s týmto spôsobom nepodarí navodiť rast embrya, prenášame ho na iné médium, ktoré navodí tvorbu kalusu.

Zrelé embryá sú používané u kultúr zrelých embryí. Embryo je plne vyvinuté a má základy púčika- *plumuly*, koreňa- *radikuly* a kľúčnych listov- *kotyledonov*. V živnej pôde stačí zrelým embryám na rast a tvorbu výhonkov len anorganické soli a sacharóza.

(Hrubíková a kol. 2009)

Embryokultúry umožňujú urýchlenie šľachtiteľských procesov môžu byť vhodné aj pri moderných metódach génového inžinierstva (Preťová, 1995).

4.5.2 Meristémové kultúry

Primárnym explantátom pri kultivácii je meristém. Je to centrum aktívne sa

deliacich buniek v rastline, kde vznikajú bunky pre pletivá a orgány. Bunky meristému majú izodiametrálny tvar, hustú cytoplazmu, tenkú bunkovú stenu, veľké jadro, malé vakuoly, nezelené proplastidy a sú bez medzibunkových priestorov.

- Protomeristémy sú založené z iniciál, teda buniek ktoré vznikli bezprostredne z embryonálnych buniek.
- Primárny meristém vznikol delením iniciál a jeho delením vznikajú bunky trvalých pletív – krycie pletivá, vodivé pletivá a základné pletivá.
- Sekundárny meristém tvoria bunky s obnovenou schopnosťou delenia sa.
- Vrcholový meristém tzv. aplikálny, nachádzajúci sa na koncoch listov a stoniek. Dáva základ listom, stonkám, kvetom a podieľa sa na bočnom rozkonáraní.
- Bočný meristém tzv. laterálny je uložený s osou orgánu napr. *kambium* v stonke.
- Včlenený meristém tzv. interkalárny. Medzi trvalými pletivami napr. Báza listov
- Okrajový alebo marginálny meristém, teda na okraji orgánov, napr. listov
- Koreňový meristém nachádzajúci sa v rastovom vrchole koreňa a tvoria sa z neho koreňové pletivá. (Hrubíková a kol. 2009)

Metóda využitia vrcholových meristémov patrí medzi najefektívnejšie spôsoby produkcie sadby a ozdravovania zdroja. Pozostáva z komplexu náročných technologických postupov a etáp. Základom je získanie zdravých a reprodukcie schopných regenerantov (Šmáhlik a kol., 1988).

4.5.3 Peľové a peľnicové kultúry

Techniky spojené s využívaním *androgenézy* tj. Tvorbou haploidných rastlín obsahujúcich polovičnú genetickú výbavu len od samčích pohlavných buniek. Na navodenie androgenézy musíme rastlinku vystaviť stresovým faktorom – tepelné alebo chladové šoky, zmena výživy, regulácia fotoperiód, centrifugáciou a i.

Základom techniky je potlačenie rastu peľníc a tým aj peľových zrn, aby sa nemohli vyvinúť na pohlavné bunky. Predchodcom tejto techniky bola vzdialená hybridizácia, ale neposkytovala požadované výsledky.

Primárnym explantátom sú mladé kvetné púčiky s nezrelými peľnicami. Sterilizujeme ich a odstránime kvetné lupienky, izolujeme peľnice a necháme kultivovať na živnej pôde. Kultúry po 3 až 8 týždňoch regenerácii v podmienkach *in vitro* sa sfarbia na hnedo. Začína

sa tvoriť kalus, ktorý núti peľnicu otvoriť sa. Kalus vzniká s dediferencovaných peľových zŕn. Rastlinka sa po určitej dobe (30 až 50mm) z kalusu oddelí a preniesie na médium s podporou rastu. Po zakorenení sa preniesie na sterilnú pôdu, napr. v kontorlovanom sklenníku (Hrubíková a kol., 2009)

4.5.4 Kalusové kultúry

Kultúru zakladáme z diferencovaných buniek, pletív alebo orgánov. Dediferenciáciou sa tieto štruktúry stanú neorganizovanými tj. Vytvorí zhluk neorganizovaného pletiva *Kalusu*. Počas procesu dediferenciácie sa špecializované bunky dostávajú do pôvodného stavu, kedy nie sú schopné uskutočniť svoj genetický program. Nato, aby sme indukovali tento proces potrebujeme pridať do živnej pôdy rastové regulátory endogénneho alebo exogénneho pôvodu.

Kalusové bunky majú veľké jadro, sú bez vakuoly, bunková stena je u všetkých buniek rovnaká. V podstate môžeme povedať, že neobsahujú špecializovanú štruktúru a nemajú žiadnu funkciu.

Navodenie tvorby kalusu je potrebný rôzny čas. Závisia od viacerých faktorov.

- Druh explantátu, cytologická, genetická a fyziologická vybavenosť
- podmienky kultivácie

V prírode by sme objavili kalus na ranách rastlín (Hrubíková a kol., 2009).

Kalusovú kultúru je možné odvodiť z každej časti rastliny, ktorá obsahuje parenchymatické bunky, schopné deliť sa a vytvoriť proliferujúcu masu buniek (Kamenická, Rypák, 1989).

4.5.5 Bunkové kultúry

Na založenie bunkových kultúr využívame drobný alebo rozpadavý kalus.

Kultivácia ja na tekutej živnej pôde. Sú to vlastne kalusové bunky rozptýlené v premiešavanom médiu. Premiešavanie je potrebné pretože kalus má schopnosť zhlukovať sa do celkov, retiazok. Do média preto pridávame vysoké koncentrácie auxínov a citokinínov (Hrubíková a kol., 2009).

Bunkové kultúry je možné na regeneráciu bezviroznych regenerantov odvodených z chorých rastlín. Avšak k účelom praktického ozdravovania tento spôsob nie je vhodný

vzhľadom na genetickú nestabilitu. Genetická variabilita sa zvyšuje s dĺžkou kultivácie *in vitro* a potlačiť ju možno navodením embryogenézy (Novák a kol. 1990).

4.5.6 Protoplastové kultúry

Protoplastom nazývame bunku úplne zbavenú bunkovej steny. Tvorí ju len cytoplazma, jadro a organely v bunke. Sféroplast je bunka čiastočne zbavená bunkovej steny.

Plazmolýzou bunky alebo enzymatickým rozkladom dokážeme bunkovú stenu odstrániť. Plazmolýzu docielime znižovaním obsahu vody v bunke alebo použitím hypertonického roztoku. Izolovaná protoplazma je protoplast.

Enzýmami celulóza a pektináza docielime to isté. Avšak najprv musíme izolovaný preparát mechanicky rozdrviť. Podmienky pre pôsobenie enzýmov sú 23-30°C, tma, pH 5,8. Izolované protoplasty premyjeme a očistíme filtráciou, alebo centrifugáciou (Hrubíková a kol., 2009).

Fúzia protoplastov vedie k získaniu buniek, ktoré obsahujú zmes organel oboch fúzných partnerov. Pri medzidruhových somatických hybridoch existuje problém nadbytku nežiadúcich vlastností neúrodného druhu (Greplová a kol., 2006).

4.5.7 Mikropropagácia *in vitro*

Mikropropagácia je proces namnoženia rastlinného materiálu využitím moderných metód pletivových kultúr. Pričom cieľom produkcie je čo najvyšší počet identických rastlín. Aplikovanie je v množení cenných genotypov, ktoré boli vytvorené klasickými metódami šľachtenia alebo genetickými modifikáciami.

Štádiá mikropropagácie:

- Založenie sterilnej kultúry: Vysadenie explantátu na kultivačné médium a následne iniciácia jeho výhonkov. V závislosti na type explantátu je tvorba výhonkov iniciovaná z existujúcich meristémov apikálnych a axilárnych púčikov vznikajúcich *de novo*.
- Multiplikácia: Tvorba mnohopočetných výhonkov, ktoré vytvárajú zhľuky

výhonkov. Oddelenie výhonkov a ich kultivácia na kultivačnom médiu, z ktorého ho môžeme opakovane odobrať a preniesť na nové.

- Tvorba koreňov: Zakoreňovacie štádium slúži na prípravu rastlinky na prenesenie z *in vitro* do *ex vitro* podmienok. Smeruje k tvorbe, predlžovaniu, koreňov a ukončuje sa zasadением v kontrolovanom a následne na konečnom stanovisku.
- Aklimatizácia: Rastlina je na konečnom stanovisku vystavená vplyvu prírodných javov. Nastáva modifikácia listov, ich prieduchy sa zfunkčujú a vytvára si ochrannú voskovú vrstvu (Hrubíková a kol. 2009).

4.6 *In vitro* techniky využívané pri šľachtení strukovín

4.6.1 Hrach

Hrach siaty *Pisum sativum* je v našich klimatických podmienkach najpestovanejšou strukovinou. Má mnoho vlastností využiteľných vo výžive ľudí, hospodárskych zvierat a plodín. K potravinárskym účelom sa využívajú semená na prípravu rôznych pokrmov, v potravinovom priemysle sa spracúva na polotovary, konzervované semená, alebo tiež ako čerstvá zelenina. Ku krmným účelom sa používajú šrotované semená hrachu nevhodné k potravinárskym účelom. Odrody vysokého rastu sa vysievajú spolu s hrachom roľným na zelené kŕmenie (Karabínová, 1998).

Pri šľachtení možno využiť tieto biotechnologické metódy:

- meristémové kultúry k ozdraveniu od vírusov, k dlhodobému skladovaniu genetických zdrojov, k indukcii mutagennézy, somatickej embryogenézy a k selekcii *in vitro* (Graman, Čurn, 1998),
- kultúry rastových vrcholov, mikropropagácia *in vitro*,
- kalusové kultúry,
- embryokultúry,
- protoplastové kultúry (Seman, 1990).

4.6.1.1 Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov, mikropropagácia *in vitro*

Meristémové kultúry sú techniky, ktoré majú veľmi blízko ku praktickému aplikovaniu. Pri hrachu je východiskovým explantátom apikálny alebo axilárny meristém, z ktorého dochádza k tvorbe celistvej rastliny v dôsledku totipotencie. Regenerácia je dvojbodová a spočíva v tvorbe výhonkov a navodenia rizogenézy, čiže tvorby koreňov. Druhým stupňom je, aby rastlina začala tvoriť výhonky.

Do kultivačného média sa musia pridať cytokiníny BAP. Limitujúcim faktorom tohto postupu je indukcia rizogenézy, ktorá je ovplyvňovaná druhom a koncentráciou auxínov IAA, NAA, IBA, minerálnych solí a sacharózy (Seman, 1990).

4.6.1.2 Embryokultúry

Základom je proces embryogenézy, kedy zo zygoty vzniká zárodok a následne celá rastlina. Kultivácia zygotických embryí patrí k najstarším explantátovým technikám. U kultivácie hrachu sú dôležité nutričné hodnoty zrelých a nezrelých embryí a tiež akumulácia proteínov a ich porovnanie s vývinom embryí *in vivo* (Preťová, 1995). Kultúry nezrelých embryí predstavujú preoembryá. Môže sa vyskytnúť v globulárnom štádiu alebo srdcovitom či torpédovom štádiu. Pri kultivovaní potrebujú viac látok v kultivačnom médiu pre rast a tvorbu výhonkov.

4.6.1.3 Protoplastové kultúry

Protoplastové kultúry rastlín hrachu vznikli buď odstránením bunkovej steny enzýmom alebo plazmolyticky. Protoplasty sú z hrachu izolované z mladých listov, rastových vrcholov, koreňov a koreňových hlúčok. Bunková stena sa odstráni pôsobením enzýmov, celulózy (0,5-1%) alebo pektinázy (0,25-0,5%). Stabilizácia obnažených buniek protoplastov sa vykonáva v osmotickom roztoku cukrov: sacharóza, glukóza, manitol, (0,3-0,6 mol). Pred kultiváciou sa protoplasty premyjú od zvyškov pletív filtráciou, centrifugáciou alebo jednoduchým premytím médiom.

Splývanie s inými protoplastami-fúziou ešte neprieskumovalo regenerovanie celej rastlinky (Seman, 1990).

4.6.1.4 Kalusové kultúry

Pojom kalus rozumieme nediferencovaný zhluk buniek, ktorý sme vytvorili z izolovaných delivých pletív hrachu. Indukcia tvorby kalusu sa vykonáva z macerovaných rastových vrcholov. Regenerácia výhonkov sa indukuje kombináciou rastových látok BAP a NAA. Používa sa striedavá teplota 20°C a 15°C, fotoperiódá 16 hodín (Seman, 1990).

4.6.2 Sója

Sója fazuľová *Glycine max L.* je jednoročná strukovina s vysoko cenenou nutričnou a biologickou hodnotou. Zo strukovín má prvé miesto v oblasti vysokého obsahu bielkovín (až 40%) a tuku (18-20%), s vysokým podielom linolovej kyseliny.

Vo výžive ľudí má význam ako výrobky- sójové mlieko, mäso, sójová múka.

Techniky biotechnologickej kultivácie sóje patria:

- meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia *in vitro*
- embryokultúry
- protoplastové kultúry
- oplodnenie *in vitro*

4.6.2.1 Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia *in vitro*

Meristémové kultúry sóje a jej mikropropagácia sú techniky, ktoré slúžia na získanie veľkého počtu rovnakých rastliniek. Tieto počty sú dôležité pre využitie sóje nielen pre spotrebu u ľudí, ale aj preto že sa pridávajú do kŕmnych zmesí. Regenerovanie rastlín s meristémov je pomocou rastových látok NAA a BAP. Pri klíčení semien rastlina potrebuje zase BAP, pri tvorbe púčikov BAP a KIN. Ak sa snažíme o predĺžovanie výhonkov musíme znížiť hladinu regulátorov a počas zakorenenia

nepridávame regulátory do média.

4.6.2.2 Embryokultúry

Využitie tejto techniky je najmä pri tvorbe medzidruhových hybridov. Spojením s kultúrami vajíčok sa podarilo získať medzidruhové hybridy. Je ale problém s praktickým uplatňovaním takýchto hybridov, lebo sú sterilné. Používajú sa hlavne nezrelé embryá aj semená. Viacerí vedci mali snahu o prekríženie s divými druhmi. V súčasnosti využívame spojenie s mutagenézou (Seman, 1990).

4.6.2.3 Protoplastové kultúry (Seman, 1990).

Metodiky u sóje sa zhodujú s technikami ako u ostatných metód. Splývaním protoplastov rôznych druhov ako jačmeň, ryža, hrach sa podarilo tiež vytvoriť hybridy. Vedcom sa podarilo regenerovať aj celé rastliny sóje z protoplastov.

4.6.2.4 Oplodnenie *in vitro*

Je to metóda, ktorá zahŕňa využitie haploidného peľu na tvorbu rastlín. Používame tri druhy techník, ktorými to dosiahneme. Ako prvé aplikujeme peľ na bliznu piestiku. Druhou metódou je aplikácia peľu na izolované placenty s vajíčkami. Využívaná je aj izolácia vajíčok a aplikácia peľu na kultivačom médiu. Nevýhodou je, že na úspešný vývin sú nepostrádateľné rastové regulátory-IAA, NAA, 2,4-D, GA₃, tiež prvky bór, vápnik, draslík, horčík a hydrolyzát kazeínu (Seman, 1990).

4.6.3 Bôb

Druh *Vicia faba L.* Bôb obyčajný je iba kultúrna plodina, ktorá pochádza z Blízkeho Východu. Taxonomicky blízka je *Vicia narbonensis*. Bôb je tiež samoopelivý aj cudzoopelivý druh plodiny. Všetky vnútrodrohové rastliny sú schopné sa medzi sebou krížiť. Avšak je tu vysoká reprodukčná izolovanosť. Počet chromozómov je 12 (Tóth, 2007). Podľa využiteľnosti v oblasti kŕmenia hospodárskych zvierat je až za sójou. Ako jadrové krmivo alebo na zelenú hmotu. Pretože bôb nedáva stabilné úrody snažíme sa aj o iné ako klasické metódy šľachtenia. Východiskom je použitie biotech-metód. Sú dôležité, aby sme nimi zvýšili najmä odolnosť bôbu proti negatívnemu vplyvu prostredia, suchu aj skrátili obdobie kvitnutia (Seman, 1990).

Z biotech- metód sa uplatňujú:

- meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia *in vitro*
- peľnicové kultúry
- protoplastové kultúry
- kalusové a suspenzné kultúry.

4.6.3.1 Meristémové kultúry, kultúry rastových vrcholov a mikropropagácia *in vitro*

Meristémy sú bunky, ktoré sa zúčastňujú na aktívnom delení buniek. Touto metódou sa zaoberali viacerí genetici. Francúzski vedci testovali odrezky semenáčikov a zistili, že tvorba koreňov sa so vzdialenosťou od rastového vrchola znižuje. Regulátorom rastu NAA sa problém tvorby koreňov vyriešil. Vhodná je kombinácia BAP a NAA pri znásobení výhonkov- proliferácii.

Pre regenerovaní z rastových vrcholov je na mikropropagáciu sú potrebné tiež regulátory NAA, BAP- na vyvolanie rastu výhonkov a IAA na rizogenézu. Regenerácia je narušovaná nekrotami explantátov, čo je dôsledkom oxidácie polyfenolov (Seman, 1990).

4.6.3.2 Peľové a peľnicové kultúry

Metódy sú založené na tvorbe haploidných, čiže n rastlín. To znamená s polovičným počtom chromozómov. Snažíme sa o zastavenie vzniku pohlavných buniek. Explantátom sú nezrelé peľnice, ktoré sa kultivujú na médiu s obsahom NAA a KIN pri delení peľových zrn bôbu. Aby sa diferencoval kalus pridali sme ešte kokosové mlieko a aktívne uhlie (Seman, 1990).

4.6.3.3 Kalusové a suspenzné kultúry

Základom je kalus, čiže nadiferencované pletivo u suspenzných kultúr ide o drobný kalus. Tvorba kalusu sa dá u bôbu navodiť z rastového vrcholu aj nezrelých kľíčnych listov. Potrebné sú opäť rastové látky. NAA pre tvorbu výhonkov, BAP pre zakorenenie. Kalusy z kľíčnych listov vznikli po veľkom znížení obsahu sacharózy. To

znamená, že okrem rastových látok sú potrebné u bôbu aj iné faktory (Seman, 1990).

4.6.3.4 Protoplastové kultúry

Protoplasty sú teda bunky zbavené bunkovej steny plazmolýzou alebo enzýmami. Pri fúzii protoplastou bôbu sa tvoria zhluky nediferencovaných buniek. Ich vplyvom sa po určitom čase delenie buniek bôbu zastaví (Seman, 1990).

4.6.4 Ostatné strukoviny

Genetické zdroje sú hlavným zdrojom práce VÚRP Piešťany, kde tvoria asi 16% tam uložených zdrojov (Šubová, 2002).

Strukoviny patria k nutrične hodnotným plodinám, avšak stále v menšej miere ako obilniny. Pre rozvoj genotypov a rozširovanie genetickej diverzity je potrebné uchovávať genetické zdroje (Benková, 2004).

U fazule záhradnej máme 4 druhy: *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus coccineus L.*, *Phaseolou lunatus L.* a *Phaseolus acutifolius L.* Všetky tieto druhy pochádzajú z divo žijúcich rastlín. Pôvodná oblasť výskytu je Južná Amerika. Všetky druhy majú v chromozóme $2n = 22$. Základnou prekážkou pri krížení je neschopnosť tvoriť normálny zárodok. Najlepšia krížiteľnosť je s druhom *Phaseolus coccineus L.* Fazuľa je samoopelivý aj cudzoopelivý druh rastlinky. Preto je tu zvýšená možnosť prekríženia s GMR (Tóth, 2007).

4.7 Podmienky kultivácie

Kultivácia *in vitro* je ovplyvňovaná podmienkami kultivácie. Sú to

- vonkajšie
- vnútorné faktory

4.7.1 Vonkajšie faktory

Svetlo

Spektrálne zloženie svetla pozitívne ovplyvňuje čerstvú hmotnosť kultúry, počet axilárnych a adventívnych výhonkov a tiež vplýva na predlžovací rast (Hrubíková a kol., 2009).

EK podľa požiadaviek na fotoperiódou delíme rozdeľujeme na kultúry s nepretržitým osvetlením alebo s rovnomernou dĺžkou fotoperiódou. Optimálna dĺžka osvetlenia je 16 – 18 hodín (Hrubíková a kol., 2009).

Teplota

Optimálne teplotné rozmedzie pri kultivovaní explantátov je 20 až 25°C. Dobro vplýva na enzymatické procesy zloženie a vlastnosti plazmalemydormanciu, adaptabilitu, hustota média a koncentráciu plynov. V značnej miere pôsobí pri chemických vlastnostiach hormónov, vitamínov alebo na expresiu génov (Hrubíková a kol., 2009).

Voda

Voda je pre primárne explantáty potrebná z hľadiska priaznivého vodného potenciálu, pre rast kultúry a pre správne fungovanie prieduchov. Voda riadi aj aktivitu pletív a zmenu relatívnej vlhkosti čo vedie k adaptovaniu rastliny (Hrubíková a kol., 2009).

Osmotický potenciál

Vhodné rozmedzie pre kultiváciu je od 37 – 219 kPa. Rast a vývin pletív, tvorba výhonkov a koreňov, somatická embryogenéza a zväčšovanie biomasy sú podmienené vhodnými hodnotami osmotického potenciálu (Hrubíková a kol., 2009).

pH kultivačného média

Optimum je 5,0 až 6,0 to znamená mierne kyslé hodnoty. To preto, aby bol zabezpečený príjem iónov a potrebná hustota média. Rast, vývin buniek a pletív je tiež spätý s pH média. (Hrubíková a kol., 2009).

Matričný potenciál

Je merná voľná energia vody v bunke. Zahŕňa všetku vodu, ktorá je pre bunku dostupná a

nie je viazaná chemickou väzbou. Môžeme ho regulovať koncentráciou agaru.

Pôsobí na vitifikáciu, teda určitú poruchu rastu pletív, ktorá sa prejaví ako zoslizovatenie či zosklovatenie. Dostupnosť vody je dôležitá aj pre rovnomerný rast a vývin celistvej rastlinky (Hrubíková a kol., 2009).

Koncentrácia plynov

Koncentrácia CO₂ vplýva na fotosyntézu rastliny a O₂ vplýva na dýchanie rastlinky. Hodnoty koncentrácie plynov kolíšu a sú závislé od rýchlosti výmeny plynov medzi kultúrou a médiom, výmeny plynov medzi nádobami a fyzikálnymi vlastnosťami kultivačných nádob (Hrubíková a kol., 2009).

Etylén

Používame v médiu ako natívny rastový regulátor a v priebehu kultivácie sa jeho koncentrácia zvyšuje. Môžeme ním buď stimulovať alebo inhibovať zložky v kultivačnom médiu. Pre rastlinu je prítomnosť etylénu nevyhnutná pre správny rast a vývin kultúry. Pôsobí aj pri tvorbe lignínu a na zakoreňovanie rastliny (Hrubíková a kol., 2009).

Typ kultivačnej nádoby

S nádobami má byť jednoduchá manipulácia a zároveň čistenie, taktiež ich musíme sterilizovať. Správnym výberom kultivačnej nádoby sa dá ovplyvniť:

rýchlosť rastu

vitifikáciu

kvalitu výhonkov a celej rastliny (Hrubíková a kol., 2009).

4.7.2 Vnútorne faktory

Dormancia

Je to fyziológiou rastlinky podmienené obdobie vegetačného pokoja. Spojené je so zníženým metabolizmom rastliny. Jej vznik môžeme podporiť viacerými poklesom teploty a metabolickej aktivity alebo zvýšeným obsahom kyseliny abscisovej ABA (Hrubíková a kol. 2009).

4.8 Kultivačné médiá

Delenie kultivačných médií:

- podľa druhu rastlín
- podľa typu explantátu
- podľa pítomnosti regulátorov rastu
- podľa konzistencie média

Základnými zložkami kultivačných médií sú hlavne uhľikaté zlúčeniny, anorganické soli, organické látky, vitamíny, regulačné látky a agar.

Uhľikaté látky

Ako zdroje uhľikátých zlúčením sú najvhodnejšie sacharidy. Najčastejšie používané sú Sacharóza, Glukóza, Fruktóza. Koncentrácia na liter média je 2-5 g. Sacharóza sa rozkladá v médiu na základné zložky, Fruktózu a Glukózu.

Anorganické soli

Základnými zložkami sú Makroprvky a Mikroprvky, ktoré sú potrebné pre stavbu nukleových kyselín, aminokyselín, enzýmov, bunkovej steny rastlín a v chlorofyle. Makroelementy sú obsiahnuté v koncentráciách vyšších ako 0,5mmol/l. Za makro látky považujeme dusík, draslík, vápnik, fosfor, síru a horčík. Makroelementy sú vo vyššej miere potrebné u suspenzných kultúr.

Koncentrácia mikroelementov je nižšia ako 0,5 mmol/l média. Sú to železo, mangán, bór, zinok, jód, meď a i.

Organické látky

V kultivačných médiách sú považované za organické nukleotidy, organické kyseliny, komplexné organické extrakty a aminokyseliny. Komplexnými látkami chápeme kvasničný extrakt, kokosový endosperm a živočíšne uhlie. Aminokyseliny sú glycín, asparagín, tyrozín, arginín alebo cysteín.

Vitamíny

Do kultivačného média sa pridávajú vitamíny ako katalyzátory metabolizmu. Vitamíny B skupiny tiamín, kyseliny nikotínová, riboflavín, pyridoxín a biotín. Tiež vitamíny E a C. Vitamíny B skupiny rastlina potrebuje pre metabolizovanie tukov, cukrov a bielkovín. Vitamín C a B2- riboflavín sú zastúpené v nižších množstvách.

Regulátory rastu

Základnými regulátormi sú auxíny a cytokiníny. Tieto majú stimulačný vplyv na rastlinu. Môžu byť prírodného aj syntetického pôvodu. Prírodné regulátory, čiže fytohormóny, pôsobia aj pri malých množstvách. Syntetické hormóny nazývame regulátory rastu.

Auxíny sú zodpovedné za delenie buniek a tvorbu kalusu, podporujú aj predlžovací rast a tvorbu rizoidov.

Cytokiníny sa používajú na navodenie tvorby výhonkov a podporujú pôsobenie auxínov pri delení buniek. Sú hlavným dôvodom prečo rastliny tvoria korene a axilárne výhonky.

Agar

Zahusťovacia zložka v médiu, ktorá je vyrábaná z červených morských rias. Agar je látka s vysokou molekulovou hmotnosťou. Pre médium aj pre rastlinu je potrebná, lebo môže udržiavať vodu. To je dôležité pre správny rast a vytvorenie celistvej rastlinky. Koncentrácia agaru v médiu je 0,6-1% (Hrubíková, 2009).

4.9 Založenie embryokultúry hrachu siateho *Pisum sativum*. L

Biologický materiál: Semená hrachu siateho

Kultivačné médiá:

Murashige-Skoog médium bez rastových látok-kultivácia embryí hrachu

Pracovné nástroje a laboratórne pomôcky: Petriho misky, skalpel, pinzeta, kultivačné poháre, guľôčkový sterilizátor

Chemikálie: 96% etanol, 5% roztok Chloramínu B, Tween 20, BAP, Sterilná destilovaná voda

- Pracovný postup:
- zrelé semená hrachu siateho sme krátko prepláchli v 96% -ným etanolom,
- sterilizácia 30 minút v 5%- nom Chloramíne B,
- prepláchnutie v sterilnej destilovanej vode, explantát sme sterilizoval vo Fatrane,
- semená stáli 24 hodín v destilovanej vode, aby nabobtnali a zmäkli,
- izolácia embryí hrachu sme vykonali pomocou pinzety a skalpela v boxe,
- embryá sme uložili na kultivačné médium,
- nádobu sme označili údajmi o založenej kultúre,
- kultivácia embryí prebieha pri 23°C a 16/8 hodinovej fotoperióde, bielym fluorescenčným svetlom a 50L μ mol/M².S⁻¹ (Hrubíková a kol. 2009).

Zloženie Murashige-Skoog kultivačného média:

- makroelementy
- mikroelementy
- železo
- vitamíny.

zložky	množstvo v g na 100ml
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	6,6
KNO ₃	7,6
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,76
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,48
KH ₂ PO ₄	0,68

zložky	množstvo v g na 1l
Mikroelementy	
H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,23
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,00250
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00250
ZnSO ₄ ·7·H ₂ O	0,86
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
KI	0,083

zložky	množstvo v g na 1l
Železo	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,112
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1,492
Vitamíny	
Tiamín- HCl	0,001
Pyridoxín – HCl	0,005
Kyselina nikotínová	0,005
Glycín	0,020

Zhodnotenie pokusu:

Z troch embryí hrachu siateho, nám začali po 3 dňoch klíčiť 2 embryá. Po 7 dňoch kultivácie mali rastlinky 2-3cm a koreňky asi 1cm. Pričom do média neboli pridané rastové regulátory. Po mesiaci kultivovania bol rastlinný materiál vhodný na presadenie do kontrolovaných skleníkov.

5 Záver

Využívanie rôznych *in vitro* techník teda v značnej miere uľahčuje tvorbu nových odrôd, regenerovanie celistvých rastlín, alebo multiplikovanie geneticky rovnakých rastlín. Vybrať najvhodnejšiu technológiu je zdĺhavý a náročný proces, pretože medzi jednotlivými druhmi strukovín sú odlišnosti. Môžu byť viac alebo menej náročné, v rozličných vývojových etapách, na obsah sacharidov, rastových látok alebo prvkov v kultivačnom médiu. Pre dokonalú regeneráciu musia byť všetky nároky rastliny splnené.

Základmi vednej disciplíny explantátových kultúr sa v značnej miere zaslúžili hlavne pokusy s embryami hrachu v rokoch 1902 -1929. W. Kotte a W. J. Robbins kultivovali koreňové špičky hrachu a kukurice v sterilných podmienkach.

V procese šľachtenia výrazne prispievajú najmä somatická embryogenéza. Realizovať ju môžeme priamo z bunky izolovaného pletiva alebo nepriamo cez štádium kalusu. Embryá indukované zo somatických teda telových buniek využívame pri množení rastlín, somatickej hybridizácii, genetickej transformácii a tvorbe umelých semien, ktoré sú uložené v gélovom obale s živinami.

Meristémovými kultúrami sa nám darí rastliny ozdravovať od vírusov. Je to vďaka ich schopnosti mitoticky sa deliť.

Kalusové kultúry sú potrebné pre produkciu sekundárnych metabolitov a enzýmov. Kalusy sa zase používajú ako primárne explantáty na šľachtenie nových odrôd alebo pri vegetatívnom množení rastlín.

Protoplasty dávajú tiež základ získavaniu geneticky jednotného potomstva. Prostredníctvom protoplastov dokážeme začleňovať cudzi gény do genómu rastlín, teda geneticky rastlinu transformovať. Takto sa vyšľachtili aj hybridy medzi rodmi hrachu a sóje odolné voči rôznym nepriaznivým faktorom a látkam.

Rastlinky rezistentné voči herbicídum sú kľúčovou generáciou produktov transgénnych rastlín. Gény rezistencie na tieto látky pôsobia rôzne a sú z viacerých zdrojov. Niektoré gény produkujú enzýmy degradujúce herbicídy, druhé vytvárajú enzýmy na znecitlivenie voči účinkom herbicídov. Rezistencia voči Glyfosátu a voči Fosfínotricínu.

Bunkové kultúry sú využiteľné pre produkciu sekundárnych metabolitov. Pred týmto postupom musíme vybrať vhodné rastlinky podľa požiadaviek na produkt

metabolizmu. Z nich na vhodnom médiu založiť kalusovú kultúru a dlhodobo udržiavať. Toto uchovávanie je potrebné na ustálenie tvorby metabolitov. Veľmi dôležitou časťou procesu je testovanie a výber najproduktívnejších línií. Z nich založíme bunkové kultúry s vlastnosťou produkcie požadovaného metabolitu.

Vo všeobecnosti sa pre tvorbu celistvej rastliny používa ako primárny explantát hlavne apikálny a axilárny meristém. Avšak je dôležitá prítomnosť rastového regulátoru BAP. Je dôležitý pre tvorbu výhonkov, multiplikácie. Aby sme navodili tvorbu koreňov je potreba Auxínu IAA, IBA, NAA.

Pri kultivácii *in vitro* sa môžu však vyskytnúť aj rôzne problémy. Niektoré explantáty obsahujú pigmenty, ktoré uvoľňujú z reznej rany do média čo znižuje regeneračnú schopnosť. Odstránime ho sterilizáciou povrchu, premývaním v sterilnej vode, kultivovaním na pórovitých materiáloch, absorpciou na aktívnom uhlí, alebo pridaním antioxidantov.

Ďalším problémom je hyperacidita v rastlinných pletivách sa hromadí voda a pletivo je vodnaté akoby sklovité. Tento stav môže spôsobiť prítomnosť cytokinínov, malým percentom agaru v médiu.

Stagnácia rastu a mnohopočetnej tvorby výhonkov je tiež veľkým problémom. Faktormi vzniku tohto problému sú nedostatok živín, hlavne vápnika, nedostatočné zloženie kultivačného média.

Začarovaným kruhom je aj návyk kultúry od rastových regulátorov (cytokinín) tzv. habitácia kultúry. Vzniká počas dlhodobej kultivácie na médiu, kedy po prenesení na médium bez rastových látok pozorujeme proliferáciu krátkych výhonkov bez schopnosti predĺženia a tvorby koreňov. V horšom prípade sa stráca schopnosť regenerácie rastliny.

Somatoklonálna variabilita je ďalším problémom pri kultivácii. Spôsobená je genetickou nestabilitou primárneho explantátu aj nestabilita vývinu kultúry. Je typická pre rastliny regenerované z kalusu (Hrubíková, 2009).

Ročná produkcia sóje sa pohybuje okolo 150 milión ton, pričom hlavný producenti sú USA, Brazília, Argentína a Čína. Viac ako polovicu produkcie v USA tvorí transgénna sója. Sója sa v súčasnosti využíva pre tvorbu viac ako 60 potravín po tepelnom spracovaní. Základnou formou v potravinárstve je múčka, olej, koncentrát, lecitín a i.

Na územie Slovenska dovážame ročne niekoľko stoviek ton sóje aj z obsahom transgéennej sóje, pretože máme obmedzené podmienky na jej pestovanie.

Vhodné podmienky sú pre pestovanie hrachu, je tu však viacero problémov.

- obsah bielkovín je vyšší u sóje ako u hrachu, ale hrach netreba tepelne upravovať pred výživou
- import sóje na naše územie je vysoký a pestovanie hrachu sa znižuje
- do krmív sa pridáva sója hoci je drahšia a na druhej strane dostupnejší hrach poľnohospodári využívajú v menšej miere
- slovenské odrody hrachu sa u nás pestujú menej ako v zahraničí
- pestovanie geneticky upravovanej sóje na našom území zákon zakazuje, ale produkty z takejto sóje na trhu máme, ale obyvatelia o tom často ani nevedia (Tóth, 2007).

Pri šľachtení sa snažíme o zvyšovanie úrody, kvality, či už výživových vlastností alebo rezistencie voči škodcom, vírusom, patogénom a herbicídom. Tieto vlastnosti sa dajú dosiahnuť genetickým manipulovaním.

6 Zoznam použitej literatúry

1. BARANEC, Tibor. 2004. *Systematická botanika*. Nitra : SPU, 2004. 210s. ISBN 80-8069-453-2.
2. BENKOVÁ, M. 2004. Variabilita genetických zdrojov fazule a šošovice. In *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. 2009 : Zborník z 11. odborného seminára*. Piešťany : VÚRP, 2004, s. 181-182. ISBN 80-88790-34-4.
3. GRAMAN, J – ČURN, V. 1998. *Šľachtění zemědělských plodin (obiloviny, luskoviny)*. České Budějovice : JČU, 1998. s. 194.
4. GREPLOVÁ, M, 2006. Úvod do štúdia asymetrickej somatickej hybridizácie. In *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín. 2006 : Zborník z 13 vedeckej konferencie*. Piešťany : VÚRP, 2006, s. 115-116. ISBN 80-88872-57-X.
5. HRUBÍKOVÁ, Katarína. a i. 2009. *Explantátové kultúry rastlín*. Nitra : SPU, 2009. s. 128. ISBN 978-80-552-0323-2.
6. KAMENICKÁ, A. - RYPÁK, M. 1989. *Explantáty v rozmnožovaní drevín*. Bratislava : 1989, 158 s.
7. KARABÍNOVÁ, Mária. a i. 1994. *Integrovaná rastlinná výroba*. Nitra : SPU, 1994. 81 s. ISBN 80-7137-476-8.
8. NOVÁK, F. J. 1990. *Explantátové kultúry a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Praha : Academia, 1990. 208 s. ISBN 80-200-0344-4.
9. PREŤOVÁ, A. 1995. *Embryogenéza vyšších rastlín v in vitro podmienkach*. Bratislava : Veda, 1995. 65 s. ISBN 80-224-0419-5.
10. RAPI, J. 1988. Šľachtenie hrachu siateho. In *Hraška Š, et al. 1988. Šľachtenie strukovín vo VÚRP Piešťany -ŠS Horná Streda*. Bratislava : Príroda, 1988. 34-47 s.
11. SEMAN, Ivan. 1990. *Biotechnologické metódy v šľachtení poľných plodín*. Bratislava : Príroda, 1990. 272 s. ISBN 80-07- 00237-5.
12. ŠMÁLIK, M. a i. 1988. Získavanie bezvirózných rastlín u rôznych genotypov zemiakov. In *Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín BIOS 88. 1988*. Nitra :

VŠP, 1988, s. 42-49.

13. ŠUBOVÁ, D. 2002. Netradičné formy propagácie genetických zdrojov strukovín.)In *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín 2002 : Zborník z 9. odborného seminára*. Piešťany : VÚRP, 2002. s 38-42.
14. ŠVIHRA, J. a i. 1981. *Fyziológia rastlín*. Bratislava : Príroda, 1981, 379 s.
15. TÓTH, Dezider. 2007. *Biologická bezpečnosť*. SPU : Nitra. 2007. 465 s. ISBN 978-80-8069-846-1.
16. *Technológia pestovania bôbu obyčajného Vicia faba*. [online] aktualizované 2009. [cit. -2010-05-17]. Dostupné na: <[http:// www. osivo. sk/ data/ bob. doc./](http://www.osivo.sk/data/bob.doc/)>.