Příloha 9.

Příprava sterilní kultury rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) a kultivace v podmínkách in-vitro

Závěrečná zpráva: září 2010

Objednatel: Univerzita Hradec Králové

Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové

Řešitel: Ing. Kamil Pásek

Sokolovská 1331/49

70800 Ostrava – Poruba

kamil.pasek@seznam.cz; www.masozravky.com

IČ: 603215739, DIČ CZ721228553

Ostrava, 30. 9. 2010

ÚVOD

Zadáním bylo připravit sterilní kulturu rdestu dlouholistého in-vitro a zpracovat protokol pro úspěšné zavedení rdestu prostřednictvím semen do in-vitro kultivace. Tato závěrečná zpráva shrnuje veškeré výsledky a pracovní postupy, uskutečněné od 27.prosince 2009 do 30. září 2010.

VÝSEV SEMEN A IN-VITRO KULTIVACE

A) PŮVOD SEMEN

Čerstvá semena sklizená na podzim roku 2009 byla poskytnuta Dr. Lubomírem Adamcem z kultury BÚ AVČR, Třeboň v následujících počtech: suchá semena (míněno vysušená při 22°C ihned po dozrání 15. 9. 2009 a od 8. 10. 2009 uskladněná ve tmě v lednici při 5°C): 47 ks; mokrá semena (míněno skladovaná po dozrání ve vodě ve tmě při teplotě 5°C): 191ks.

B) MÉDIUM PRO VÝSEV

Byly zvoleny dvě kombinace výsevního média:

1) Tuhé: 10% MS méduim (Murashige-Skoog) s 20% sacharózy a 0,6% gerlite. Do jedné výsevní zkumavky bylo použito cca 10 ml média.
2) Tekuté: 10% MS médium s 20% sacharózy. Bylo použito cca 20 ml tekutého média do jedné výsevní zkumavky.

pH média nastaveno na 6,5 před rozlitím do zkumavek. Zkumavky s médii uzavřené hliníkovými vršky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121°C.

C) PŘÍPRAVA SEMEN NA STERILIZACI – PŘEDMYTÍ

Suchá i mokrá semena byla dne 27. 12. 2009 máčena ve vodě s přídavkem několika kapek jaru a protřepávána po dobu 27 až 39 hodin před vlastní sterilizací. Občasně bylo prováděno odstraňování „osemení“ a přischlých zbytků jemným třením na sítku pod tekoucí vodou. Voda pro před mytí byla často měněna.

D) VLASTNÍ STERILIZACE SEMEN

Sterilizace semen proběhla dne 28-29. 12. 2009 ve třech časových sterilizačních skupinách po dobu 4, 8 a 16 hodin protřepáváním ve sterilizačním roztoku (bylo použito komerční SAVO PRIM) v koncentracích 100% (tedy bez ředění) a 50% (tedy naředěné destilovanou vodou).

Počty použitých semen, koncentrace sterilizačního roztoku a čas sterilizace:

Sterilizace: suchá semena (47 ks)				**Sterilizace: mokrá semena (191 ks)**			
Kód	koncentrace (%)	čas (h)	počet semen (ks)	Kód	koncentrace (%)	čas (h)	počet semen (ks)
01	100	16	8	02	100	16	28
01	100	8	8	02	100	8	30
01	100	4	8	02	100	4	30
01	50	16	8	02	50	16	30
01	50	8	8	02	50	8	46
01	50	4	7	02	50	4	27

Po uplynutí sterilizačního času (následné práce již prováděny sterilně v aseptickém prostředí flow-boxu) byly semena opláchnuty následným postupem:

a) Semena byla ponořena do lahví s 500 ml sterilní vodovodní vody s přídavkem 100mg kyseliny citronové/ 1 litr a rychle protřepána.
b) Poté byly semena přeneseny do lahví s 500 ml sterilní vodovodní vody s přídavkem 100mg kyseliny citronové/ 1 litr a protřepávána po dobu 2 hodiny.
c) Poté byla semena přenesena do lahví s 500 ml sterilní vodovodní vody, rychle protřepány a přeneseny na sterilní Petriho misku odkud byly rozděleny do výsevních zkumavek.

E) VÝSEV STERILIZOVANÝCH SEMEN

Semena byla vysetá po jednom kusu do jedné výsevní zkumavky a to polovina semen do média tekutého a druhá polovina na médium tuhé. Klíčení probíhá v šeru, první měsíc při teplotách 14-18°C, následně již při konstantní teplotě 18°C. Semena jsou pravidelně kontrolována a zřetelně klíčící semena jsou přenášeny na osvětlené stoly (zářivky / 21°C).

VÝSLEDKY

První semena začínají klíčit již po cca 15 dnech, avšak souběžně se začínají objevovat první kontaminace, zejména u semen sterilizovaných nižší koncentrací SAVA a po krátký čas.

Následující tabulky zobrazují počty sterilně vyklíčených semen k 30.9.2010, kdy bylo sledování klíčení ukončeno.

Kontrola (datum)	Klíčí (ks)
20. 1. 2010	21
28. 1. 2010	2
10. 2. 2010	2
24. 2. 2010	6
29. 3. 2010	4
6. 5. 2010	8
29. 7. 2010	5
29. 9. 2010	1

Počty použitých semen, koncentrace sterilizačního roztoku, čas sterilizace a celkový počet vyklíčených a zkontaminovaných semen:

Sterilizace: suchá semena (47 ks)						**Sterilizace: mokrá semena (191 ks)**					
Kód	koncentrace (%)	čas (h)	počet semen (ks)	počet vyklíčených semen	počet zkontaminovaných semen	Kód	koncentrace (%)	čas (h)	počet semen (ks)	počet vyklíčených semen	počet zkontaminovaných semen
01	100	16	8	6	0	02	100	16	28	11	0
01	100	8	8	1	0	02	100	8	30	5	1
01	100	4	8	1	2	02	100	4	30	8	8
01	50	16	8	4	2	02	50	16	30	5	2
01	50	8	8	4	2	02	50	8	46	4	16
01	50	4	7	0	3	02	50	4	27	0	27

Celkem:	**47**	**16**	**9**	**Celkem:**	**191**	**33**	**54**

Dílčí závěry:

1. Celkem vyklíčilo 49 ks semen (28%); z toho 25 na pevném médiu a 24 ks na tekutém médiu. Forma média (tekutá x pevná) tedy neměla na klíčení rostlin vliv. (pozn.: kontaminovaná semena pro procentuelní výpočty jsou ignorována)
2. Celkově suchá semena klíčila ve 42%, mokrá ve 24%. Na sucho skladovaná semena mají procentuelně vyšší klíčivost.
3. Lépe klíčila semena sterilizovaná 100% SAVO (31%) než ta sterilizovaná 50% SAVO (23%). Vyšší koncentrace sterilizačního činidla mírně zvyšuje klíčivost.
4. Lépe klíčila semena sterilizovaná delší čas 16 hod (37%) než sterilizovaná 8 hodin (19%). Varianta sterilizovaná 4 hod je neinterpretovatelná, kvůli 100% kontaminaci. Vyšší sterilizační čas zvyšuje klíčivost semen a odbourává jejich dormanci.
5. Klíčení rdestu je rozvleké, po první výrazné vlně v průběhu první dvou měsíců, semena v dalších měsících dále dokličují.
6. Nejmenší koncentrace sterilizačního činidla a času vykazuje 100% kontaminaci pro semena skladovaná v mokru.

F. PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA

Jako výchozí kultivační médium bylo zvoleno 50% Gamborg B5 médium s redukovaným KNO_3 (modifikace podle: Adamec A., Pásek K., 2000. Medium optimization for growing *Aldrovanda vesiculosa* in vitro. Carniv. Plant. Newslett. (Fullerton) 29: 122-124.), které bylo dále zjednodušeno použitím již předpřipravených zásobních médií holandské firmy Duchefa (www.duchefa.com).

Složení „zásobního“ média uvádí následující tabulky:

Složení směsi mikro-elementů v 1000mg/l. (Gamborg B5 Medium, Micro-salt mixture, katalogové číslo: M0302.0025):

$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg/l
FeNaEDTA	36,70 mg/l
H_3BO_3	3,00 mg/l
KI	0,75 mg/l
$MnSO_4.H_2O$	10,00 mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25 mg/l
$ZnSO_4.7H_2O$	2,00 mg/l
KNO_3	947,25 mg/l

Složení směsi makro-elementů v 1000mg/l. (Gamborg B5 Medium, Macro-salt mixture, katalogové číslo: M0304.0025):

$CaCl_2$	113,23 mg/l
NaH_2PO_4	130,44 mg/l
$(NH_4)_2SO_4$	134,00 mg/l
$MgSO_4$	121,56 mg/l
KNO_3	500,77 mg/l

Složení směsi vitamínů v 1ml zásobního roztoku. (Gamborg B5 Medium, Vitamin mixture, katalogové číslo: G0415.0250):

Myo-Inositol	100,00 mg/l
Nicotinic acid	1,00 mg/l
Pyridoxin HCL	1,00 mg/l
Thiamine HCL	10,00 mg/l

Složení finálního tekutého média použitého pro kultivaci rdestu:

Mikroelementy Gamborg B5 médium	0,5 g/l
Makroelementy Gamborg B5 médium	0,5g/l
Vitamíny Gamborg B5 médium	1ml/l
Sacharóza	25g/l
pH	5,7 nebo 6,5

Množství tekutého média bylo 50-70 ml ve 350ml sklenici anebo později 300 ml ve 500 ml sklenici. pH před autoklávováním bylo nastaveno na 5,7 anebo 6,5 s pomocí KOH. Sklenice s médii uzavřené hliníkovými anebo plastovými vršky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 20-45 minut (podle objemu média) při teplotě 121°C.

G. IN-VITRO KULTIVACE RDESTU

Dne 24. 2. 2010 muselo být přistoupeno k prvnímu přesazení rostlin na tekuté médium s vyšším obsahem živin (složení viz výše), neboť vyklíčené rostliny začaly na výsevním médiu rychle degradovat. Po přesazení se jejich stav rychle zlepšil a rostliny zrychlily růst, zesílily a začaly odnožovat. Stejně bylo postupováno i s dalšími vyklíčenými rostlinami, které byly přesazovány do jednoho měsíce po vyklíčení.

Následně bylo v pravidelných 2-3 měsíčních cyklech prováděno přesazovány sterilních kultur rdestu na nové kultivační médium. Byla sledována dynamika růstu a spontánního množení (bez přídavku fyto-hormonů) v podmínkách in-vitro. Také byl sledován vliv pH média a množství média k optimálnímu růstu rostlin.

Během 2-3 měsíců množící se rostliny rdestu postupně vyplnily kultivační sklenice a kultura začala pozvolna chřadnout (konečné pH média bylo v rozmezí 4,65-6,25). Bylo nutné přesazení. Vždy se do nového média přesazovaly pouze 1-3 růstové vrcholy s poměrnými částmi oddenku, ve finální fázi před dalším přesazováním bylo ve sklenici cca 8-15 vrcholů, různé velikosti. Přebytky rostlin byly poskytnuty do BÚ AVČR Dr. L. Adamcovi k venkovnímu zapěstování.

Sterilní rostliny byly kultivovány při 21°C s umělým osvitem 12 hodin denně (dvě lineární zářivky, cca 20-30 PAR) a to staticky na stolech (bez třepání).

Došlo také k vyřazení několika kultur (šesti), které uspokojivě nerostly a některé již zavedené kultury při přesazování zkontaminovaly. K dnešnímu dni je aktuálně deponováno 30 jednotlivých klonových linií rdestu, které jsou individuálně označeny a uchovávány, každá

ve dvou paralelních sklenicích. Přebytky rostlin z kultur budou poskytnuty BÚ AVČR anebo UHK k dalšímu využití. Taktéž s kulturami bude dále nakládáno podle dispozic zadavatele.

Dílčí závěry:

1. Použité tekuté médium Gamborg B5 v navrhované modifikaci se jeví jako vhodné pro dlouhodobou kultivaci rdestu v podmínkách in-vitro. Rostliny na něm dobře rostou a během 2-3 měsíců vyplní objem sklenice. Na rostlinách nejsou patrné žádné deformace ani poruchy růstu.
2. Rostliny se také dobře množí – přibližně 4-6 násobně za jeden kultivační cyklus. Pro kontinuální růst bez stagnace je nutné je přesazovat alespoň co 2-3 měsíce na nové médium. Není také pozorováno žádné omezení růstu během zimního období.
3. Testovaný objem média cca 50-70 ml ve 350ml sklenici (výška hladiny média cca 1cm) a submerzní pěstování se jeví jako nedostatečné, z důvodů neuspokojivého růstu listů nad médiem a jejich částečné degradace na konci kultivačního cyklu. Rostlina uvítá plné ponoření do alespoň 300ml média v 500ml sklenicích (výška hladiny 7cm). Větší množství média a větší sklenice se jeví mnohem více optimální, neboť rostliny mohou vyrůst na délku i 12cm v jednom kultivačním cyklu.
4. Testované pH 5,7 je pro rdest příliš kyselé, rostliny rostou mnohem lépe na médiu s vyšším pH 6,5, které více odpovídá ekologickým nárokům tohoto druhu.

ZÁVĚR

Z 238 ks sterilně vysetých semen rdestu dlouholistého sterilně vyklíčilo k dnešnímu dni 49 ks semen, které daly základ pro 30 jednotlivých klonových linií, které jsou dále deponovány a pravidelně přesazovány. Podařilo se odvodit úspěšný protokol pro převod rdestu dlouholistého prostřednictvím semen do podmínek in-vitro a také optimalizovat další dlouhodobou in-vitro kultivaci na tekutém modifikovaném médiu Gamborg B5. Kultury mohou sloužit pro dostatečné namnožení rostlin ve sterilních podmínkách jak již pro re-introdukce anebo jako cenný materiál pro další výzkum tohoto kriticky ohroženého druhu.

Fotodokumentace:

001-003 Klíčící semena rdestu na tekutém a tuhém médiu, leden 2010. Zkumavky mají průměr 3 cm.
004 Degradované rostliny na výsevním médiu, 24.2.2010
005-008 Rostliny přesazené na nové médium s více živinami, 29.3.2010. Průměr sklenice je 8 cm.
009 Finální klonové linie rdestu ve 300 ml tekutého média (500 ml sklenice) po zářivkami.
010 Detail „degradace“ projevující se ve starších kulturách na listech vyčnívajících nad médiem. Na další kultivaci nemá toto lokální poškození listů žádný vliv.
011 Optimálně narostlé kultury ve stáří dvou měsíců, vhodné k převodu do kultury anebo k přesazení do nového média.