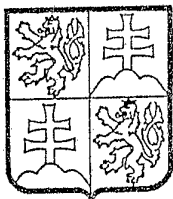


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 396

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 7763-87. S

(22) Přihlášeno : 29 10 87

(30) Prioritní data : 30 10 86 - FR - 86/8615299

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 01 H 4/00

(40) Zveřejněno : 11 06 91

(47) Uděleno : 20 03 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 13 05 92

(73) Majitel patentu : RHONE-POULENC AGROCHIMIE, LYON (FR)

(72) Původce vynálezu : FREYSSINET GEORGES,
FREYSSINET MARTINE, ST CYR AU MONT d'OR (FR)

(54) Název vynálezu : Způsob regenerace slunečnicových rostlin .

(57) Anotace :

Způsob regenerace kultivarů slunečnice z nezralých embryí ve třech stupních. V prvním stupni se vytváří embryogenní kalus v prostředí, které obsahuje hormon typu cytokininu, ve druhém stupni se získaný materiál pěstuje v prostředí obdobného typu jako v prvním stupni, potom se dále pěstují takto získané rostlinky. První dva stupně se provádějí bez auxinu.

Vynález se týká způsobu regenerace slunečnicových rostlin z buněk nebo tkání somatickou embryogenezi. Způsobem podle vynálezu je možno získat slunečnicové rostliny a semena.

Přestože je možné regenerovat rostliny z izolovaných buněk nebo z tkání velkého počtu pěstovaných druhů, snahy o regeneraci slunečnice (*Helianthus annuus*) byly často bezvýsledné. Několik málo způsobů je popsáno v literatuře a vztahuje se na somatickou embryogenesi, avšak tyto postupy se vztahují pouze na vzácné genotypy nebo na mezidruhové hybridy. Explantáty se pěstují na prvním živném prostředí, které indukuje tvorbu kalusu. Kalus se potom přenesou do druhého prostředí, které indukuje tvorbu somatických embryí a rostlinek. Tyto rostlinky se potom přenesou do třetího prostředí, které indukuje tvorbu kořenů, v tomto stupni je potom možno regenerovanou rostlinu přenést do půdy.

Paterson a Everett v publikaci *Plant Sci.*, 1985, 42, 125 navrhli prostředí, které je optimalizací prostředí, popsaného v publikaci Georgieva Todorova a dalších, *Proc. 9th Int. Sunflower Conference*, Torremolinos, Španělsko 1980, 122, kde se popisuje regenerace kultivovaných druhů slunečnice SS 415 B somatickou embryogenezi z fragmentů hypokotylu. Explantáty se pěstují dva týdny ve tmě, potom 2 až 4 týdny na světle v modifikovaném prostředí podle Murashigeho a Skooga (MS), doplněném 40 mg/litr adeninsulfátu, 1 mg/l 6-benzylaminopurinu (BAP), 1 mg/l kyseliny naftalenoctové (NAA) a 0,1 mg/l geberelinu (GA_3). V průběhu prvních dvou týdnů se vytvoří kalus, potom je možno na světle pozorovat tvorbu zelených skvrn, které se mění ve výhonky. Anatomické sledování potvrdilo, že uvedené zelené skvrny jsou somatická embrya, která jsou podobná zygotickým embryím.

V publikaci Chandler a Jan, *Agronomy Abstr.* 1983, 58 se popisuje regenerace slunečnice z nezralých embryí, získaných při mezidruhovém křížení. Nezralá embrya (4 až 5 dnů) se uloží na růstové prostředí, popsané v publikaci Chandler a Beard, *Crop. Sci.*, 1983, 23, 1004 jako prostředí, vhodné pro pěstování embryí. Po dvou až třech týdnech se ta embrya, která se zvětšila, přenesou na různá prostředí, jejichž základem je prostředí MS a která obsahují různá množství auxinu a cytokininu. K produkci rostlin na těchto prostředích dochází různými cestami včetně přímé tvorby kalusu s následnou organogenezi nebo embryogenezi. Nejlepších výsledků je možno dosáhnout při koncentraci kyseliny indolactové (IAA) a kinetinu v rozmezí 0 až 1 ppm. Výhodou tohoto systému je mnohočetná tvorba klonů z jediného embrya.

Cooley a Wilcox v evropské patentové přihlášce č. 172 377 navrhuji postup, který byl proveden na kultivarech slunečnice HA 89 a RHA 274 a který sestává ze shora uvedených tří stupňů, provedených na třech různých živných prostředích, přičemž živná prostředí v prvních dvou stupních musí obsahovat hormon typu auxinu. Tento postup však má řadu nevýhod, protože na jedné straně je možno jej použít v případě embryí, jejichž rozměr spadá do úzkého rozmezí 0,1 až 2 mm, na druhé straně je zapotřebí mezi prvním a druhým stupněm živné prostředí vyměnit a konečně stupeň regenerace rostlin, kterého je možno uvedeným způsobem dosáhnout je stále velmi neuspokojivý.

Vynález si klade za úkol navrhnout jednodušší postup pro regeneraci kultivarů slunečnice, z nezralých embryí, tj. buněk nebo tkání. Tento postup se podle vynálezu provádí tak, že se:

- v prvním stupni pěstují nezralá embrya v indukčním živném prostředí s obsahem hormonu typu cytokininu vybraného ze skupiny zahrnující kinetin, 6-benzylaminopurin, 2-isopen-tyladenin a zeatin,
- ve druhém stupni pěstují uvedená somatická embrya za podmínek, umožňujících jejich klíčení a jejich vývoj na rostlinky, popřípadě vytvářející kořeny, v živném prostředí, vhodném pro růst rostlin,
- popřípadě se rostlinky přenesou do třetího prostředí umožňujícího tvorbu kořenů rostlinek, získaných ve druhém stupni,
- přičemž první dva stupně se provádějí na živném prostředí stejného typu s obsahem sacharó-

zy, jejíž koncentrace se pohybuje v rozmezí 8 až 12 g na 100 ml v prvním stupni a v rozmezí 2 až 4 g na 100 ml ve druhém stupni, prostředí obsahuje účinné množství hormonu typu cytokininu bez hormonu typu auxinu.

Výhodně lze použít jako hormonu 6-benzylaminopurinu, přičemž výhodná je koncentrace 0,1 až 8 $\mu\text{mol/l}$ v obou stupních.

Dále lze výhodně použít koncentrace 6-benzylaminopurinu v prvním stupni 2,2 až 4,4 $\mu\text{mol/l}$ a ve druhém stupni 0,44 až 4,4 $\mu\text{mol/l}$. Výhodná koncentrace sacharózy je 9 g na 100 ml v prvním a 3 g na 100 ml ve druhém prostředí. Živné prostředí obsahuje v prvním stupni anorganické živné soli a ve druhém navíc vitaminy a aminokyseliny. Výhodně lze k postupu použít embrya stará 4 až 21 dnů o velikosti 0,1 až 5 mm, přičemž tato embrya lze rozdělit na několik fragmentů, schopných regenerace. Způsob lze provádět tak, že se po druhém stupni indukuje tvorba kořenů o sobě známými způsoby.

Výhodně se rostlinky po druhém stupni přenesou do půdy a inkubují se v klimatické komoře při teplotě 15 °C při intenzitě světla 6 000 lux a při době osvětlení 15 h denně.

Pokud rostlinky nezískají kořeny, lze je použít k naroubování.

V následující popisné části a v příkladech jsou veškeré koncentrace uvedeny v g/100 ml, není-li uvedeno jinak.

Rostlinné tkáně pro odběr explantátů k získání somatických embryí pocházejí z kultivarů slunečnice *Helianthus annuus*, které jsou obvykle užívány při šlechtění. Při provádění způsobu podle vynálezu bylo konkrétně užito osmi kultivarů, a to: HA 89, HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76, RT 26 a Giant Gray Stripe. Varieta HA 89 pochází z Dade Counts, Florida, variety HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76 a RT 26 pocházejí z Seedtec International Inc., Woodland, California a Giant Gray Stripe pochází z Northrup King Seeds, Fresno, California.

Explantáty se získají z rostlin, pěstovaných ve skleníku s použitím řízeného hnojení. Výhodným explantátem pro tvorbu kalů je nezralé embryo. Nezralá embrya s perikarpem se izolují ze slunečnice ve stáří 4 až 21 dnů, jejich rozměr se pohybuje obvykle v rozmezí 0,1 až 5 mm. Nezralá embrya větších rozměrů je možno rozdělit na několik stejných dílů podle rovin, procházejících osou vegetativní vrchol-kořen, čímž je možno dosáhnout většího počtu klonů z jediného embrya.

Způsob podle vynálezu je možno prakticky uskutečnit následujícím způsobem:

Variety slunečnice HA 89, HA 290, HA 291, HA 300, HA 303, T 76, RT 26 a Giant Gray Stripe se kultivují ve skleníku při teplotě 26 °C, osvětlení 40 000 lux, světelné periodě 15 hodin denně a za řízeného hnojení. Nezralá embrya se odeberou 4 až 21 dnů po opylení. Odebraná semena se sterilizují tak, že se na 20 minut ponoří do běžně dodávaného Javellova roztoku ve vodě s chlorometrií 3° s několika kapkami smáčedla Tween 80 (kondenzát ethylenoxidu- 8 až 10 molů- s nonylfenolem), potom se semena třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Potom se embrya izolují za aseptických podmínek, v případě potřeby se rozřežou a uloží se na první, tak zvané indukční prostředí pro embrya.

Toto první prostředí obsahuje anorganické soli, vitaminy, aminokyseliny, sacharózu a hormony v dostatečném množství pro tvorbu kalů. Anorganické soli jsou jak soli makroelementů, tak soli stopových prvků. Makroelementy, zvolené pro první stupeň je možno volit například z následujících sloučenin: síran hořečnatý, chlorid vápenatý, dihydrogenfosforečnan draselný, dusičnan draselný a dusičnan amonný. Ze solí stopových prvků může jít například o kyselinu boritou, síran manganatý, síran zinečnatý, molybdenan sodný, síran měďnatý, chlorid kobaltnatý, jodid draselný a chelát železa se sodnou solí kyseliny ethylendiamintetraoctové. Tato směs solí je známa pod názvem Murashoge a Skoog (MS).

Dále bude uvedeno výhodné množství makroelementů a stopových prvků na 1 litr živného prostředí:

Heptahydrát síranu hořečnatého	370 mg
dihydrát chloridu vápenatého	440 mg
dihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného	170 mg
dusičnan draselný	1 900 mg
dusičnan amonný	1 650 mg
kyselina boritá	6,2 mg
tetrahydrát síranu manganatého	22,3 mg
heptahydrát síranu zinečnatého	8,6 mg
dihydrát molybdenanu sodného	0,25 mg
pentahydrát síranu měďnatého	0,025 mg
hexahydrát chloridu kobaltnatého	0,025 mg
jodid draselný	0,83 mg
chelát železa a Na EDTA	36,7 mg

První prostředí také obsahuje vitaminy, například kyselinu nikotinovou, thiamin, pyridoxin, myo-inositol a aminokyseliny, například alanin, glutamin, serin, tryptofan, cystein a s výhodou glycin. Výhodná množství vitaminů a aminokyselin na 1 litr prostředí jsou následující:

kyselina nikotinová	0,5 mg
thiaminhydrochlorid	0,1 mg
pyridoxinhydrochlorid	0,5 mg
myo-inositol	100 mg a
glycin	2 mg.

První prostředí může také obsahovat směs vitaminů a aminokyselin, která sice není nezbytná pro tvorbu somatických embryí, avšak zvyšuje četnost jejich výskytu. Dále budou uvedena výhodná množství vitaminů a aminokyselin v uvedené směsi na množství 1 litr:

kyselina nikotinová	0,5 mg
thiaminhydrochlorid	0,1 mg
pyridoxinhydrochlorid	0,5 mg
myo-inositol	4 000,0 mg
L-alanin	1 000,0 mg
L-glutamin	800,0 mg
L-serin	160,0 mg
L-tryptofan	50,0 mg
L-cystein	10,0 mg
glycin	2,0 mg.

První živné prostředí obsahuje sacharózu v množství 8 až 12 g/100 ml, s výhodou v množství 9 g/100 ml.

Hormonem pro první živné prostředí, typickým pro způsob podle vynálezu je hormon typu cytokininu, například kinetin nebo 6-benzylaminopurin, s výhodou 6-benzylaminopurin. Obvykle se užívá množství 0,5 až 1 mg/litr. Ke zpevnění živného prostředí se užije agar, například prostředků Phytagar nebo Gelrit. Dobrých výsledků je možno dosáhnout s konečnou koncentrací 0,6 % prostředku Phytagar nebo 0,3 % prostředku Gelrit. Živné prostředí se upraví na pH 5,0 až 6,3, s výhodou je 5,0.

Živné prostředí se sterilizuje v autoklávu s výjimkou hormonů, které se sterilizují filtrací mikroporézní membránou.

Nezralá embrya, uložená na toto první prostředí se pěstují přibližně 2 až 3 týdny ve tmě při teplotě 26 °C. V průběhu této doby se vyvinou zygotická embrya a somatická embrya se objeví na hypokotylu a na vnitřní straně kotyledonů v případě kultivaru HA 291. Tato somatická embrya je potom možno izolovat a uložit na druhé prostředí, které slouží pro pěstování rostlinek. Embryogenní kalus izolovaných embryí se pěstuje na druhém prostředí 2 až 3 týdny při teplotě 26 °C na světle (1 500 lux) při době osvětlení 12 až 16 hodin denně,

s výhodou 16 hodin denně. V průběhu této doby dojde ke klíčení embryí a vytvořené rostlinky počínají vytvářet kořínky.

Druhé živné prostředí obsahuje stejně jako první živné prostředí anorganické soli, vitaminy a aminokyseliny, sacharózu a hormon. Z anorganických solí obsahuje soli makroelementů a soli stopových prvků. Jde o stejné makroelementy, stopové prvky, vitaminy a aminokyseliny jako v případě prvního prostředí a také koncentrace je stejná, neužívá se však doplňková směs vitaminů a aminokyselin. Sacharóza je s výhodou obsažena v nižším množství než je tomu v prvního prostředí, například v množství 2 až 4 g/100 ml, s výhodou 3 g/100 ml. Použitým hormonem je cytokinin, s výhodou totožný jako v prvního prostředí, je však možno užít i odlišného hormonu, s výhodou se užívá 6-benzylaminopurin. Obvykle se užije množství 0,1 až 0,5 mg/litr. Ke zpevnění živného prostředí se obvykle užije opět Phytagar nebo Gelrit. Dobrých výsledků je možno dosáhnout při použití konečné koncentrace 0,6 % Phytagaru a 0,3 % Gelritu. Prostedí se sterilizuje stejně jako svrchu a má pH 5,0 až 6,3, s výhodou se užije pH 5,0.

Po 2 až 3 týdnech pěstování na druhém prostředí izolovaná somatická embrya vyklíčí a přemění se na rostlinky o velikosti 2 až 5 cm. Ty rostlinky, které vyvinuly kořeny je možno převést do půdy, do sterilní směsi rašeliny, vermikulitu a jemného písku v poměru 3 : 2 : 1 v Jiffyho květináčích. Květináče se uloží na podnos, naplněný vlhkým pískem a pokryjí průhledným polyethylenovým pytlím k udržení vysokého stupně vlhkosti. Celek se potom uloží do klimatické komory při teplotě 15 °C, osvětlení 40 000 lux, době osvitů 12 až 16 hodin denně, s výhodou 15 hodin denně. Po 10 dnech se rostlinky přenesou do větších květináčů a pěstují se ve skleníku při teplotě 26 °C, osvětlení 40 000 lux, době osvitů 12 až 16 hodin denně, s výhodou 15 hodin denně.

Rostlinky, které nevyvinuly kořeny je možno buď naroubovat na mladé rostlinky, pěstované ve skleníku obvyklým způsobem, popsáným v publikaci Habermann a Wallace, Amer. J. Bot. 1958, 45, 479, nebo přenést na 10 až 20 dnů do prostředí pro vývoj kořenů (třetí prostředí).

Třetí prostředí obsahuje anorganické soli, vitaminy a sacharózu. Anorganickými solemi jsou soli makroelementů a soli stopových prvků. Soli makroelementů v tomto třetím prostředí je možno volit z následujících sloučenin: síran hořečnatý, chlorid vápenatý, dihydrogenfosforečnan sodný, dusičnan draselný a síran amonný. Ze solí stopových prvků je možno užít kyselinu boritou, síran manganatý, síran zinečnatý, molybdenan sodný, síran měďnatý, chlorid kobaltnatý, jodid draselný a chelát železa se sodnou solí EDTA. Tato směs anorganických solí je známa pod názvem B5. Výhodná množství sloučenin makroelementů a stopových prvků ve třetím prostředí na 1 litr prostředí jsou následující:

heptahydrát síranu hořečnatého	250 mg
dihydrát chloridu vápenatého	169 mg
dusičnan draselný	3 000 mg
kyselina boritá	3 mg
tetrahydrát síranu manganatého	13,2 mg
heptahydrát síranu zinečnatého	2,0 mg
dihydrát molybdenanu sodného	0,25 mg
pentahydrát síranu měďnatého	0,025 mg
hexahydrát chloridu kobaltnatého	0,025 mg
jodid draselný	0,75 mg a
chelát železa s Na EDTA	40,0 mg.

Třetí prostředí obsahuje také vitaminy. Jsou to kyselina nikotinová, thiamin, pyridoxin a myo-inositol. Výhodná množství těchto vitaminů na 1 litr prostředí budou dále uvedena:

Kyselina nikotinová	1 mg
thiaminhydrochlorid	10 mg
pyridoxinhydrochlorid	1 mg a
myo-inositol	100 mg.

Třetí prostředí také obsahuje sacharózu, aktivované uhlí nebo hormon auxinového typu. Sacharóza je přítomna například v množství 1 až 2 g/100 ml, s výhodou 1 g/100 ml, aktivované uhlí v množství 0,1 g na 100 ml. V případě, že je výhodné použít místo aktivovaného uhlí hormonu, užije se obvykle kyselina 3-indolactová v dávce 0,1 až 0,2 mg/litr. Ke zpevnění živného prostředí se obvykle užije Phytagar nebo Gerlite v konečné koncentraci 0,5 g/100 ml pro Phytagar nebo 0,25 g/100 ml pro Gerlite. Živné prostředí může mít pH v rozmezí 5,0 až 6,0, s výhodou 5,0. Živné prostředí se sterilizuje v autoklávu.

Rostlinky se pěstují na tomto živném prostředí 2 až 3 týdny při teplotě 26 °C na světle při osvětlení 1 500 lux s dobou osvětlení 12 až 16 hodin denně, s výhodou 16 hodin denně. Rostliny za těchto podmínek vytvoří kořeny a je možno je přemístit do půdy.

Rostliny, získané shora uvedeným způsobem se mohou fenotypicky lišit od výchozího materiálu, vzhledem ke stressu, kterým je pěstování in vitro. Rostliny se opylují ručně a uchovávají se až do sklizně semen. Několik semen se dále pěstuje k analýze nových rostlin slunečnice a k dalšímu možnému šlechtění a výběru výhodných mutant, které je potom možno zařadit do různých šlechtitelských programů.

Vynález bude podrobněji popsán v souvislosti s následujícími příklady.

Příklad 1

Příprava zásobních roztoků

a) Zásobní roztok B5

Zásobní roztok B5 v desetinasobné koncentraci se připravuje tak, že se balení živného prostředí B5 rozpustí bez sacharózy (výrobce Flow Laboratories). Prostředí obsahuje anorganické soli prostředí B5, 1 mg kyseliny nikotinové, 1 mg hydrochloridu pyridoxinu, 10 mg hydrochloridu thiaminu a 100 mg inositolu ve 1 000 ml destilované a deionizované vody. Zásobní roztok se rozdělí na podíly po 100 ml a skladuje se při teplotě -20 °C.

b) Zásobní roztok BAP

Zásobní roztok BAP s obsahem 1 g/litr se připraví tak, že se rozpustí 100 mg 6-benzylaminopurinu v několika ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,15 mol/l, roztok se opatrně zahřeje a zředí na objem 100 ml destilovanou a deionizovanou vodou. Potom se roztok sterilizuje filtrací přes filtr o velikosti otvorů 0,2 µm (membrána Minisart NML, Sartorius), potom se roztok přidává k prvnímu a druhému živnému prostředí.

c) Zásobní roztok IAA

Roztok IAA s obsahem 0,2 g/litr této látky se připraví tak, že se 20 mg kyseliny 3-indolactové rozpustí v několika ml absolutního ethanolu a potom se roztok zředí na 100 ml destilovanou a deionizovanou vodou. Získaný roztok se potom sterilizuje filtrací přes filtr s otvory 0,2 µm (membrána Minisart NML, Sartorius), potom se roztok přidává ke třetímu prostředí.

d) Doplnkový roztok vitaminů a aminokyselin

Složení roztoku bylo uvedeno v publikaci Chandler a Beard (Crop. Sci. 1983, 23, 1004).

Zásobní roztok vitaminů a aminokyselin 20x koncentrovaný se získá tak, že se rozpustí 39 g myoinositolu, 10 g L-alaninu, 8 g L-glutaminu, 1,6 g L-serinu, 0,5 g L-tryptofanu a 0,1 g L-cysteinu ve 500 ml destilované a deionizované vody. Zásobní roztok se rozdělí na podíly po 50 ml a potom se skladuje při teplotě -20 °C.

Příklad 2

Příprava živných prostředí

a) První prostředí - pro indukci růstu embryí

Toto prostředí se připravuje tak, že se rozpustí balení prostředí podle Murashigeho a Skooga bez sacharózy (Flow Laboratories), které obsahuje anorganické soli prostředí MS, 0,1 mg hydrochloridu thiaminu, 0,5 mg kyseliny nikotinové, 0,5 mg hydrochloridu pyridoxinu,

2 mg glycinu a 100 mg inositolu a 90 až 120 g sacharózy v destilované a deionizované vodě. Po případném přidání doplňků vitaminů a aminokyselin (500 ml) se pH upraví na 5,0 přidáním hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l, objem se doplní na 1 litr a po přidání 6 g prostředku Phytagar (Gibco) nebo 3 g prostředku Gerlite (Kelco) se směs sterilizuje v autoklávu 20 minut při tlaku 0,84 MPa. Jakmile je prostředí vlažné, přidá se 2,2 až 4,4 $\mu\text{mol/l}$ (0,5 až 1 ml) prostředí BAP sterilizovaného shora uvedeným způsobem. Potom se směs vlije do Petriho misek.

b) Druhé prostředí - pro růst rostlinek

Druhé prostředí se připraví stejně jako první prostředí tak, že se rozpustí balení prostředí MS, 30 g sacharózy a 6 g Phytagaru nebo 3 g Gelritu a po sterilizaci v autoklávu se přidá 0,44 až 2,2 $\mu\text{mol/l}$ (0,1 až 0,5 ml) sterilního roztoku BAP. Prostedí se vlije do Plantconových misek (Flow Laboratories).

c) Třetí prostředí - pro tvorbu kořínků

Třetí prostředí se připraví tak, že se přidá 10 až 20 g sacharózy ke 100 ml zásobného roztoku prostředí B5 v destilované a deionizované vodě. Potom se pH upraví na hodnotu 5,0 přidáním hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l, objem se doplní na 1 litr a přidá se 5 g prostředku Phytagar a 1 g aktivovaného uhlí. Po sterilizaci v autoklávu se prostředí vlije do baněk (Mason). V případě, že třetí prostředí má obsahovat IAA, nepřidává se aktivované uhlí, avšak po sterilizaci v autoklávu se přidá 0,57 až 1,14 $\mu\text{mol/l}$, 0,5 až 1 ml sterilního roztoku IAA k vlažnému živnému prostředí. Potom se prostředí vlije do baněk (Mason).

Kapalná varianta třetího prostředí obsahuje pouze anorganické soli prostředí B5 a 1 g sacharózy při pH 5,0. Směs se rozdělí na podíly po 10 ml do skleněných zkumavek s mřížkou z filtračního papíru způsobem, popsáným v publikaci Chandler a Beard, Crop. Sci. 23, 1004 (1983) a potom se prostředí sterilizuje v autoklávu.

Příklad 3

Nezralá embrya s perikarpy se oddělí ze slunečnice (*Helianthus annuus*, var. T 26 B) po dosažení velikosti 0,5 až 1,5 mm. Semena se sterilizují 20 minut v Javellově roztoku ve vodě s chlorometrií 3^0 a potom se promyjí destilovanou vodou. Nezralá embrya se potom vyjmou ze slupek a uloží do Petriho misek na první živné prostředí. První živné prostředí se připraví shora uvedeným způsobem s obsahem 90 g/litr sacharózy a 0,5 mg/litr, 2,2 μmol BAP.

Petriho misky se potom inkubují ve tmě tři týdny, aby došlo k tvorbě somatických embryí.

V tomto stupni se somatická embrya, která počnou klíčit, oddělí od zygotických embryí a uloží na druhé živné prostředí do misek (Plantcon). Druhé živné prostředí se připraví také shora uvedeným způsobem a obsahuje 0,1 mg BAP v 1 litru (0,44 $\mu\text{mol/l}$). Potom se embrya pěstují na světle tři týdny, v této době dochází k jejich diferenciaci na rostlinky.

Rostlinky o výšce 2 až 5 cm se potom přenesou na třetí prostředí k vyvolání tvorby kořínků. Třetí prostředí se připraví shora uvedeným způsobem a s výhodou obsahuje 10 g sacharózy. V případě, že běží o gelovité živné prostředí, je možno přidáním aktivního uhlí v množství 1 g/litr odstranit zbytkovou účinnost BAP v předchozím prostředí, jak bylo popsáno v publikaci Maene a Debergh, Plant Cell Tissue Organ Culture 5, 23-33 (1985) a dosáhnout rychlého růstu kořenů. Po přibližně dvou týdnech je možno rostlinky přenést do půdy.

V případě, že rostlinky počaly vyvíjet kořínky již na druhém živném prostředí, je možno je uložit do styku s kapalným třetím prostředím způsobem, popsáným v publikaci Chandler a Beard, Crop. Sci. 23, 1004, 1983. Tímto uspořádáním je možno dosáhnout dobrého vývoje kořenového systému a současně se vyvarovat poškození kořenů při přenášení rostlinek do půdy.

Příklad 4

Nezralá embrya *Helianthus annuus*, var. HA 89 se odstraní, jakmile dosáhnou velikosti 0,1 až 0,5 mm a i s endospermem se uloží na první živné prostředí. První živné prostředí obsahuje 90 g sacharózy v litru a 0,5 mg, 2,2 μ mol BAP v litru. Po třech týdnech ve tmě se somatická embrya izolují a uloží stále ještě ve tmě na čerstvé první živné prostředí. Na izolovaných embryích se vytvoří sekundární somatická embrya. Po třech týdnech ve tmě se sekundární somatická embrya izolují a uloží na druhé živné prostředí. Druhé živné prostředí obsahuje 30 g sacharózy v 1 litru a 0,1 mg, 0,44 μ mol BAP v 1 litru.

Rostlinky, které se vyvinou je potom možno přenést do třetího prostředí, kapalného nebo gelovitěho k tvorbě kořenů. Tak je možno dosáhnout vývoje rostlinek s kořeny, které je potom již možno přenést do půdy.

Příklad 5

Nezralá embrya *Helianthus annuus*, var. HA 89 se odstraní 21 dnů po opylení. V této době mají rozměr 5 mm. Semena se vyjmou ze slupek a před uložením na první živné prostředí se semena podélně rozřežou na čtyři stejné části podél dvou rovin, na sebe kolmých a rovnoběžných s osou pupen-kořen. V tomto případě obsahuje první živné prostředí 90 g sacharózy v 1 litru a 1 mg BAP v 1 litru. Po třech týdnech ve tmě se somatická embrya izolují a uloží se na druhé živné prostředí. Toto druhé živné prostředí obsahuje 30 g sacharózy v 1 litru a 0,5 mg BAP v 1 litru.

Rostlinky, které se vyvinou je potom možno přenést do třetího živného prostředí, kapalného nebo gelovitěho k tvorbě kořenů s následným přenesením rostlinek do půdy. Rostlinky, které kořeny nevytvořily je možno naroubovat na mladé rostliny způsobem popsáným v publikaci Habermann a Wallace, *Amr. J. Botan.* 45, 479, 1958.

Příklady 6 až 27

V následujících příkladech jsou uvedeny alespoň některé možnosti kombinací, kterých je možno dosáhnout při provádění způsobu podle vynálezu.

Příklad	Varieta	Rozměr mm	Řezy	Základní prostředí	Sacharóza %	BAP mg/l	Základní prostředí	Sacharóza %	BAP mg/l	Tvorba kořenů
6	T 76	1,5	-	modMS ^x	9	1	modMS ^x	3	1	modMS ^x +3%sa- charóza + 0,5 mg BAP
7	T 76	1,5	-	modMS ^x	9	1	modMS ^x	3	1	III SC
8	T 76	1,5	-	modMS ^x	9	1	modMS ^x	3	1	III L
9	T 76	1,5	-	MS	9	1	MS	3	1	III SC
10	T 76	1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III SC
11	T 76	1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III L
12	T 76	1,5	-	supMS ^{xx}	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,1
13	T 76	≍ 3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
14	T 76	≍ 3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
15	T 76	5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
16	T 76	5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
17	RT 26	≍ 1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,1	III L
18	RT 26	≍ 3	-	supMS ^{xx}	9	0,5	MS	3	0,1	III SC
19	HA 89	≍ 1,5	-	MS	12	0,5	MS	3	0,5	III SC
20	HA 89	≍ 3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC
21	HA 89	≍ 3	-	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
22	HA 89	≍ 89	-	supMS ^{xx}	9	0,5	MS	3	0,1	III SC
23	HA 89	5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III SC

24	HA 89	5	+	MS	9	0,5	MS	3	0,5	III L
25	HA 89	> 5	+	MS	9	1	MS	3	0,5	III SC
26	HA 291	≤ 1,5	-	supMS ^{xx}	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,1
27	HA 291	5	+	supMS ^{xx}	9	0,5	MS	3	0,1	III SA 0,2

Poznámky k tabulce:

^x = modifikované prostředí MS obsahuje 600 mg dihydrátu chloridu vápenatého, 1 260 mg dusičnanu draselného, 1 100 mg dusičnanu amonného a 250 mg myo-inositolu na 1 liter živného prostředí, ostatní složky zůstávají beze změny.

^{xx} = doplněné prostředí MS

III SA = pevné prostředí III + 0,1 nebo 0,2 mg/litr IAA

III SC = pevné prostředí III + aktivované uhlí

III L = kapalné prostředí III

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob regenerace slunečnicových rostlin *Helianthus annuus* somatickou embryogenezi z buněk nebo tkání, vyznačující se tím, že se postupně

- v prvním stupni pěstují nezralá embrya v indukčním živném prostředí s obsahem hormonu typu cytokininu ze skupiny kinetin, 6-benzylaminopurin, 2-isopentyladenin a zeatin,
- ve druhém stupni pěstují uvedená somatická embrya za podmínek, umožňujících jejich klíčení a jejich vývoj na rostlinky, popřípadě vytvářející kořeny v prostředí, vhodném pro růst rostlin,
- popřípadě se rostlinky přenesou do třetího prostředí umožňujícího tvorbu kořenů rostlinek, získaných ve druhém stupni,

přičemž první dva stupně se provádějí na živném prostředí stejného typu s obsahem sacharózy, jejíž koncentrace se pohybuje v rozmezí 8 až 12 g/100 ml v prvním prostředí a v rozmezí 2 až 4 g/100 ml ve druhém prostředí, prostředí obsahuje účinné množství hormonu typu cytokininu bez hormonu typu auxinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako hormon užije 6-benzylaminopurin v koncentraci 0,1 až 8 μ mol/l v prvním i ve druhém prostředí.

3. Způsob podle kteréhokoliv z bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se užije koncentrace 6-benzylaminopurinu v prvním prostředí 2,2 až 4,4 μ mol/l a ve druhém prostředí se užije koncentrace 0,44 až 4,4 μ mol/l této sloučeniny.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím že se v prvním prostředí užije koncentrace sacharózy 9 g/100 ml a ve druhém prostředí 3 g/100 ml.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že živné prostředí ve druhém stupni obsahuje anorganické soli, vitaminy a aminokyseliny ve stejném množství jako první prostředí, které potom neobsahuje doplněk vitaminů a aminokyselin.

6. Způsob podle kteréhokoliv z bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že se pěstují nezralá embrya ve stáří 4 až 21 dnů s rozměrem 0,1 až 5 mm, přičemž tato embrya je možno rozdělit na několik fragmentů, schopných regenerace.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se po druhém stupni u získaných rostlinek indukuje tvorba kořenů.

8. Způsob podle kteréhokoliv z bodů 1 až 7, vyznačující se tím, že se po druhém stupni rostlinky, které mají kořeny přenesou do půdy a inkubují v klimatické komoře při

teplotě 15 °C při intenzitě světla 6 000 lux a při době osvitů 15 hodin denně.

9. Způsob podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že se po druhém stupni získané rostlinky užijí k naroubování.