

## Oponentský posudek

**Vypracoval:** Ing. Josef Patzak, Ph.D., Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, Žatec

**Věc:** Rozbor příčin neúplného přenosu genetické informace v procesu výroby sadby chmele v kultuře *in vitro*, č.j. ÚKZÚZ 025791/2019

**Autoři:** kolektiv pracovníků ÚKZÚZ, Hroznová 2, Brno

1) Již z názvu celé studie vyplývá, že byl zvolen naprosto nevhodně a z genetického hlediska je naprosto chybný. Pokud by docházelo k neúplnému přenosu genetické informace, jednalo by se především o ztrátu části nebo celého chromozómu, a takovéto rostliny pak nesou naprosté růstové anomálie, které jsou někdy až letální. Při procesu dědičnosti je též informace v buňce stále kopírována a je tudíž v procesu produkce sadby při kultivaci *in vitro* nodální kulturou stále stejná a neměnná. Pokud by došlo k mutaci na úrovni jaderné DNA, která by byla trvalá v genomu rostliny, pak by byly i následné rostliny takto vzniklé z těchto buněk shodné a projevovaly se u všech rostlin z ní množených, což v sadbovém materiálu jako celku nebylo prokázáno. V celém sledování problematiky bylo opomenuto zásadní genetické dogma, že fenotyp rostliny je tvořen genotypem a vlivem prostředí. Vliv prostředí, jako jsou agrotechnika pěstování, hnojení a ochrana rostlin, vodní a teplotní profil během růstu rostliny, jakož i samotný výchozí stav u ozdraveného materiálu, který je prostý od všech patogenů, tak výrazně ovlivňují fenotypové projevy a znaky u rostlin chmele. Proto nelze jednoznačně deklarovat fenotypové změny pouze genetickými změnami, pokud nebyl sledován a hodnocen vliv prostředí.

2) Jako pracoviště s dlouhodobou vědeckou aktivitou na poli genetiky chmele jsme vyvinuly velice účinný nástroj kontroly genomu chmele pomocí molekulárních markerů, který byl využit též v rámci genetických analýz zadaných ÚKZÚZ v roce 2017. V těchto analýzách vykazoval vzorek č.3 odlišnosti na úrovni sledovaných DNA markerů od ŽPČ. Lze však s naprostou jistotou vyloučit, že by se tento vzorek dostal do porostu se sadbovým materiálem ŽPČ. Tato rostlina prokazatelně vznikla zkřížením ŽPČ s planým samčím genotypem z okolí a jako semenáč vyrostla na prázdném místě v chmelnici. Fenotypově může být velice podobná ŽPČ a nevím do jaké míry je zachovaný polohopis vzorků, aby ji bylo možné otestovat znovu s vzorky planých samčích genotypů v okolí, abychom toto křížení potvrdili. Výrok o štěpení a degradaci genetické informace v kultuře *in vitro* je tak naprosto nepravdivý.

3) V rámci odborné diskuse vyplynuly určité kritické body, které mohou způsobovat genetické/epigenetické změny. Dovolte mi, abych se k jednotlivým bodům vyjádřil:

- Regenerací rostliny z meristému došlo pouze jednou a to na počátku založení kultury *in vitro*. Poté byly rostliny množeny pouze z diferencovaných pletiv.
- Během kultivace *in vitro* je prováděno pouze řízkování a tvorba kalusového pletiva na místě poranění je minimální a vede pouze k tvorbě kořenů a nikterak neovlivňuje rostoucí meristemické pletivo diferencovaných pupenů. Sterilační prostředky nejsou používány.
- Donorové rostliny pocházely z udržovacího šlechtění ŽPČ, a jak bylo zmíněno v popisu skutečnosti, založení kultury bylo v letech 1988, 1996 a 1998. Veškerý pěstovaný ozdravený materiál na chmelnicích v ČR od tak pochází z těchto meriklonů.

Vždy vykazoval všechny znaky ŽPČ a fenotypové odlišnosti (bujnější růst, větší listová plocha, delší pazochy, vyšší náchylnost plísní chmele a vyšší obsah alfa hořkých látek v prvních letech) byl způsoben pouze ozdravením.

- Složení média je standardní a je používáno pro všechny množené odrůdy chmelové sadby v podmínkách *in vitro*. U těchto 10 odrůd a dalších klonů ŽPČ by tedy muselo způsobovat stejné genetické/epigenetické změny.
- Růstové regulátory a hormony (cytokininy a auxiny) nejsou v kultivačním médiu používány.
- U tohoto bodu nelze popřít, že *in vitro* kultura je dlouholetá a nelze tak vyloučit vliv *in vitro* kultivace na úroveň metylací (Peredo *et al.* 2009) či hladinu hormonů (Plačková *et al.* 2015). Tyto epigenetické a hormonální změny ovšem po převedení do polních podmínek většinou vymizí. Totéž potvrzují i Smýkal *et al.* (2007), kde rostliny hrachu z 24 let kultivované nodální kultury nevykazují žádné rozdíly od původních genotypů. Relevantní důkazy o možných genetických/epigenetických změnách neexistují a bude potřeba toto prověřit v rámci našich experimentů.
- Materiály *in vitro* jsou oprostěny od všech endogenních patogenů.
- Termoterapie byla provedena pouze jednou a to na začátku založení kultury *in vitro*.
- Aktivita retrotranspozonů u chmele je nulová.

Jelikož je kultivace *in vitro* hojně používána k vegetativnímu množení rostlin, byla podrobena mnoha studiím, které prokázaly genetickou stabilitu těchto kultur. Při existenci somaklonální variability, nebyla u rostlin množných z vrcholových a axilárních pupenů nikdy nalezena (Krishna *et al.*, 3 Biotech 6:54, 2016). Abychom se ujistili, i my jsme požádali o odbornou diskusi naše přední odborníky a pracovníky v této oblasti. Odpovědi na naše otázky uvádíme v příloze. Výsledky diskuse lze shrnout takto:

1. Myslíte si, že mohou probíhat dramatické dědičné změny v genomu intaktních rostlin, množných z nodálních řízků (růst nové rostliny z axilárních či apikálních meristémů) v podmínkách *in vitro*?

Dědičné genetické změny neprobíhají. Možnost vzniku epigenetických změn při vysokém selekčním tlaku.

2. Myslíte si, že frekvence mutageneze u intaktních rostlin v podmínkách *in vitro* a *in vivo* je rozdílná (bez selekčního tlaku a cílené mutageneze)?

Míra mutageneze v obou systémech je shodná. Důležitý je vliv vnějších faktorů, jež může být v *in vivo* podmínkách paradoxně vyšší. Při použití stresových a mutačních faktorů v podmínkách *in vitro* se frekvence zvýší. Přesto spíše epigenetické změny.

3. Myslíte si, že je významný rozdíl mezi mikromnožením nodálním řízkem ve skleníkových a *in vitro* podmínkách?

Rozdíly jsou spíše technologické, kdy je třeba aklimatizace a různé způsoby kořenění. *In vitro* je efektivnější a materiály jsou bez patogenů. Přesto je třeba se věnovat snížení stresových faktorů. Je zde výrazná odlišnost pro jednotlivé rostlinné druhy a nelze tak problematiku zobecnit.

Závěrem lze říci, že tvrzení o genetické degradaci ŽPČ je chybné a není podloženo žádným důkazem. Lze zcela vyloučit genetické změny v jaderné DNA vzniklé v podmínkách *in vitro*. Epigenetické změny vyloučit nemůžeme, jakož ani jejich dopad na fenotypové projevy. Přesto, i kdyby takovéto změny proběhly, stále se geneticky jedná o rostliny ŽPČ. Vždyť samotná epigenetická variabilita, vzniklá prostředím po dobu tisíce let pěstování, dala vzniknout výběrům Osvaldových klonů, a lokálním odrudám Spalt, Tett nang, Striesselspalt, Nadwislawsky a Lubelski.

Nemůžeme ani souhlasit s výrokem, že bychom někdy pochybili a nedodrželi pravidla výrobního a množitelského cyklu, a námi dodávaná sadba tak byla vadná.

V Žateci, 6.6.2019

Ing. Josef Patzak, PhD.