Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie

Karolína Kalinová

Metody chemické indukce polyploidie

Methods of chemical induction of polyploidy

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Dora Čertnerová, Ph.D.

Praha, 2026

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Dále prohlašuji, že při přípravě předložené práce byly použity následující nástroje generativní AI uvedenými způsoby:

Při přípravě práce byl použit nástroj ChatGPT 4 a Microsoft Copilot v období 1.11.2025 – 29.4.2026. Nástroje jsem použila ke stylistickým úpravám částí textu. Po použití uvedených nástrojů umělé inteligence jsem důkladně revidovala a upravila obsah podle potřeby a plně přejímám odpovědnost za výslednou podobu práce.

V Praze, 30.4.2026

Poděkování:

Tímto bych ráda vyjádřila upřímné poděkování mé školitelce RNDr. Dorce Čertnerová, Ph.D., za odborné vedení, užitečné rady, motivaci a její vždy ochotný a vstřícný přístup.

Velké Díky patří také mé rodině a nejbližším, kteří mi poskytovali podporu, pochopení a trpělivost po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Polyploidie, přítomnost více než dvou chromozomových sad, představuje významný biologický fenomén s dopady na strukturu i funkci organismů. Vzhledem k jejímu potenciálu pro zvýšení využitelných vlastností je polyploidie často cíleně uměle indukována metodami. Tato práce se zabývá především chemickou indukcí polyploidie, která v současnosti představuje nejrozšířenější přístup. Používaná antimitotická činidla zasahují do buněčného cyklu, narušují tvorbu dělicího vřeténka nebo cytokinezi a vedou ke zdvojení genetického materiálu.

Tato práce porovnává hlavní skupiny těchto látek, včetně jejich mechanismů účinku, efektivity a omezení, jakými mohou být toxicita či vznik mixoploidních jedinců. Dále shrnuje přímé i nepřímé metody detekce polyploidie, přičemž zdůrazňuje význam průtokové cytometrie. Práce rovněž uvádí příklady úspěšně indukovaných polyploidů z řad rostlin, živočichů i mikrořas a hodnotí jejich morfologické a fyziologické změny. Na základě těchto poznatků jsou diskutovány možnost praktického využití polyploidie v experimentech a biotechnologiích.

Klíčová slova: syntetičtí polyploidi, antimitotické látky, kolchicin, oryzalin, gigas efekt, průtoková cytometrie, mikrořasy

ABSTRACT

Polyploidy, defined as the presence of more than two sets of chromosomes, is a significant biological phenomenon with implications for both the structure and function of organisms. Given its potential to enhance desirable traits, polyploidy is often deliberately artificially induced. This thesis focuses primarily on the chemical induction of polyploidy, which is currently the most widely used method. The antimitotic agents used interfere with the cell cycle, disrupt spindle formation or cytokinesis, and lead to the duplication of genetic material.

This thesis compares the main groups of these agents, including their mechanisms of action, efficacy, and limitations, such as toxicity or the emergence of mixoploid individuals. It further summarizes direct and indirect methods for detecting polyploidy, emphasizing the importance of flow cytometry. The thesis also presents examples of successfully induced polyploids from plants, animals and microalgae and evaluates their morphological and physiological changes. Based on these findings, it discusses the potential applications of artificial polyploids in experiments or biotechnology.

Keywords: synthetic polyploids, antimitotic agents, colchicine, oryzalin, gigas effect, flow cytometry, microalgae

OBSAH

1 ÚVOD 1

2 POLYPLOIDIE A JEJÍ VLASTNOSTI 1

2.1 Přirozený výskyt 3

3 UMĚLÉ NAVOZENÍ POLYPLOIDIE 4

3.1 Fyzikální metody indukce polyploidie 4

3.1.1 Hydrostatický tlak 5

3.1.2 Teplotní šoky 5

3.1.3 UV záření 5

3.2 Chemické metody indukce polyploidie 6

3.2.1 Oxid dusný 6

3.2.2 Kolchicin a jeho deriváty 7

3.2.2.1 Kolchicin 7

3.2.2.2 Demekolcin 8

3.2.3 Dinitroaniliny 9

3.2.3.1 Oryzalin 9

3.2.3.2 Další dinitroaniliny 10

3.2.4 Kofein 11

3.2.5 Fosforthioimidáty 11

3.2.6 Karbamáty 12

3.2.7 Benzimidy 12

3.2.8 Cytochalasin B 13

3.2.9 Další chemická činidla 14

3.2.10 Problém nedostatku protokolů 14

4 METODY DETEKCE POLYPLOIDIE 15

4.1 Přímé metody detekce 15

4.1.1 Počítání chromozomů 15

4.1.2 Mikrospektrofotometrie a mikrofluorometrie 16

4.1.3 Průtoková cytometrie 16

4.1.4 Další molekulárně-genetické metody 17

4.2 Nepřímé metody detekce 17

4.2.1 Analýza morfologie epidermis 17

4.2.2 Pozorování gigas efektu 18

4.2.3 Analýza morfologie erytrocytů 18

5 SKUPINY S ÚSPĚŠNĚ INDUKOVANOU POLYPLOIDIÍ 19

5.1 SYNTETIČTÍ POLYPLOIDI ŽIVOČICHŮ 19
5.2 SYNTETIČTÍ POLYPLOIDI ROSTLIN 19
5.3 SYNTETIČTÍ POLYPLOIDI MIKROŘAS 20
5.3.1 Biotechnologický potenciál 22
6 ZÁVĚR 22
7 PŘÍLOHA 23

1 ÚVOD

Polyploidie je stav buňky, při kterém buňka obsahuje tři a více kompletních chromozomových sad namísto běžných dvou (Winkler, 1916). Podle původu zdvojení chromozomové sady se dělí na dva základní typy. Autopolyploidie vzniká duplikací sad v rámci jednoho druhu, často v důsledku selhání meiózy nebo mitózy (Stebbins, 1950). K duplikaci genomu dochází také fúzí neredukovaných gamet (Levan, 1938). Oproti tomu alopolyploidie je navozena hybridizací různých druhů a následnou duplikací nově vzniklého genomu. Zdvojení chromozomů znovu obnovuje plodnost jinak často sterilních mezidruhových kříženců (Stebbins, 1950; Ramsey a Schemske, 1998).

Zvláštním příkladem polyploidie je endopolyploidie neboli somatická polyploidie popisuje, kdy se v rámci jedné tkáně, pletiva nebo jednoho organismu, vyskytují buňky s různou ploidií. Jedná se o zcela přirozený jev, který vzniká procesem endoreduplikace (Barow & Meister, 2003; Hase et al., 2006). Oproti tomu mixoploidie (případně buněčný chimérismus) popisuje nežádoucí formu genetické heterogenity. V jednom pletivu či tkáni se tak vyskytují populace buněk různé ploidie, nejčastěji diploidní a tetraploidní. Z vývojového hlediska se často jedná o velice nestabilní a často pouze přechodný stav (Thao et al., 2003; Väinölä, 2000; Zlesak et al., 2005).

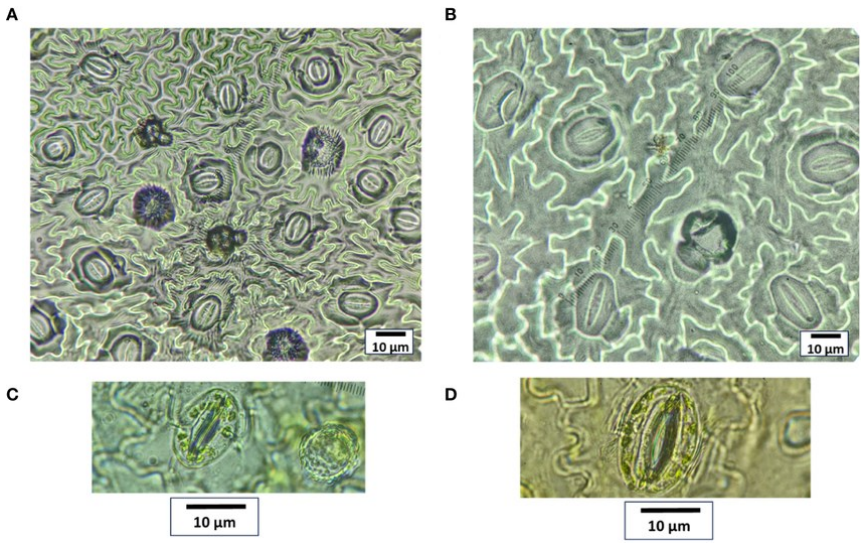
Polyploidní organismy často vykazují řadu vlastností, které jsou vysoce žádané v zemědělství, šlechtitelství, průmyslu či biotechnologiích. Ale vzhledem k tomu, že spontánní výskyt polyploidů je v přírodě u mnohých organismů velice vzácný, je tento stav za účelem výzkumného i komerčního využití často cíleně navozován uměle (Zlesak et al., 2005).

Cílem této práce je shrnout nejčastěji užívané metody chemické indukce polyploidie. Na základě literární rešerše má práce za cíl nejen jmenovat, ale také porovnat jednotlivá chemická činidla a poukázat na jejich výhody i limitace. Dalším cílem je uvést skupiny organismů, u kterých byla polyploidie úspěšně indukována, shrnout nejčastější vlastnosti těchto syntetických polyploidů a navrhnout jejich možné využití.

2 POLYPLOIDIE A JEJÍ VLASTNOSTI

Zmnožení chromozomových sad představuje pro organismus masivní změnu, která obvykle mívá řadu morfologických a fyziologických dopadů (Bharati, Fernández, et al., 2023; Zlesak et al., 2005). Ačkoli existují obecné charakteristiky polyploidů, některé konkrétní projevy polyploidizace se mohou mezi různými organismy lišit (Fankhauser, 1945; Chen, Wang a Zhao, 2006). Jedním z velmi častých a zásadních dopadů je tzv. gigas efekt. Jedná se o zvětšení objemu buňky a jejích organel (Berger a Witkus, 1943; Stebbins, 1950). U rostlin je gigas efekt často spojen i se zvětšením orgánů a s celkovým nárůstem biomasy (E. R. Morgan et al., 2003; Winkler, 1916). Polyploidi se tak, oproti jejich nepolyploidním příbuzným, vyznačují většími květy, plody a semeny (Kermani et al., 2003). Mnohdy

také dochází ke zvětšování pylových zrn i svěracích buněk u průduchů (Masterson, 1994; Ownbey, 1950).



Obr.. 1: ***Morfologie a četnost průduchů meduňky lékařské*** *A) a C) diploid B) a D) tetraploid (Bharati, Gupta, et al., 2023)*

Popsány byly i tlustší a tmavší listy v důsledku většího množství chlorofylu (Bharati, Fernández, et al., 2023). Běžně dochází také ke zvýšené produkci různých metabolických látek a esenciálních olejů, například u máty klasnaté (*Mentha spicata;* Bharati *et al.*, 2023). Rostliny mívají zároveň robustnější vzrůst, zkrácená internodia, stonky rostoucí do šířky a stimulovanější tvorbu postranních výhonů. (Bharati, Fernández, et al., 2023).

Obr.. 2: ***Morfologie listů máty klasnaté*** *A) triploid B)hexaploid (Bharati, Fernández, et al., 2023)*

U živočichů je naopak celková velikost těla více regulována. Zvětšený obsah buněk je totiž často vyvažován snížením počtu buněk. U živočichů se tedy polyploidie nemusí promítnout do celkové velikosti těla (Jung et al., 2026; Purdom, 1972). Některé jiné morfologické dopady polyploidie však vidíme i zde. Například u mloků, byly pozorovány růstové odchylky vedoucí k zakřivení osy těla, špičatějšímu tvaru hlavy a sníženému obsahu melanoforů v kůži (Fankhauser, 1945). Rostoucí stupeň ploidie u živočichů však také negativně souvisí s životaschopností a fertilitou jedinců. Polyploidní živočichové obecně pomaleji rostou nebo mají sníženou fyziologickou aktivitu. Takové projevy polyploidie byly pozorovány na příkladu platýse olivového (*Paralichthys olivaceus*) nebo pstruha duhového (*Oncorhynchis mykiss*; Jung *et al.*, 2026; Solar, Donaldson a Hunter, 1984). Vliv polyploidie na tělesný růst však může být i opačný. U tilapie zlaté (*Tilapia* aurea) nebo piskoře dálnovýchodního (*Misgurnus anguillicaudatus*) vedla polyploidie naopak ke zvýšení růstu a vývinu (Valenti, 1975; Zhou *et al.*, 2008). Vliv polyploidie na tělesný růst se tak na úrovni druhů může značně lišit.

2.1 Přirozený výskyt

Polyploidie je v přírodě poměrně častá, zato taxonomicky velice nerovnoměrná. Nejčastěji se vyskytuje u krytosemenných rostlin, u kterých prošlo až 70 % z nich ve své evoluci alespoň jedním kolem polyploidizace (Stebbins, 1950; Masterson, 1994). Novější studie z roku 2009 dokonce naznačuje, že by tato čísla mohla být ještě vyšší (například Wood *et al.*, 2009). Naopak u nahosemenných rostlin, jako jsou například jehličnany (Coniferae), je polyploidie velmi vzácná a u cykasů (Cycadophyta) se nevyskytuje zřejmě vůbec (Levin & Wilson, 1976; Wood et al., 2009). Jedním z klíčových faktorů, které mohou omezit vznik a udržení polyploidie, jsou reprodukční bariéry spojené s rozdílnou ploidií. U rostlin se jedná o tzv. triploidní blok, při kterém křížením jedinců s odlišnou ploidií (diploid a tetraploid) dochází k narušení vývoje endospermu a vzniku jedinců s výrazně nižší fitness (například Morgan *et al.*, 2021). Podobným evolučním mezikrokem přes nestabilní (triploidní) stav prochází při přechodu k vyššímu stupni polyploidie (například ke stabilnější tetraploidii) také živočichové. V případě úspěšného vzniku stabilního tetraploida je šance na jeho uchycení ale stále nízká. Jeho rozmnožení s běžnými diploidními jedinci v populaci by totiž opět vedlo k produkci sterilních triploidních potomků. Polyploidizace u živočichů tak představuje ve většině případů pouze slepou vývojovou větev (Muller, 1925). U živočichů je situace dále komplikována chromozomálním mechanismem určování pohlaví. Systémy XX/XY nebo WZ/ZZ vychází z diploidního mechanismu, kdy jsou chromozomy rozděleny a pohlaví je určeno jejich kombinací. Polyploidie může narušit rovnováhu poměru genů na pohlavních chromozomech a autozomech. Nevyvážený stav je typický pro triploidy (například 2 pohlavní chromozomy X ku 3 sadám autozomů), kdy poměr genů neodpovídá samičímu ani samčímu standardu. Intersexuální jednici se hůře vyvíjejí a bývají sterilní. I přes zmíněné komplikace se polyploidie hojně vyskytuje u ryb (Cuellar & Uyeno, 1972), plazů (například ještěrek; Pennock, 1965) a obojživelníků, kde ji nalezneme především u žab (Ptacek et al., 1994). Také u určitých skupin bezobratlých je polyploidie běžným evolučním fenoménem. Zejména se jedná o organismy

s partenogenezí, tedy nepohlavním rozmnožováním přímo z neoplozeného vajíčka (Fankhauser, 1945). Příkladem je žábronožka solná (*Artemia salina*), u které byly nalezeny diploidní, tetraploidní i oktaploidní formy (Gross, 1932).

3 UMĚLÉ NAVOZENÍ POLYPLOIDIE

Jak již bylo uvedeno výše, polyploidie může organismům přinášet řadu výhodných vlastností, které mohou být zároveň využitelné pro zvýšení jejich výnosu či odolnosti. U zemědělsky či biotechnologicky zajímavých organismů je tak snaha navodit polyploidii i uměle. Syntetická indukce polyploidie, tedy cílený genetický a cytologický zásah do organismu, je běžnou metodou využívanou zejména u šlechtitelských rostlin (Zlesak, Thill a Anderson, 2005; Dhooghe *et al.*, 2011). Očekávaným výstupem bývá morfologické vylepšení rostlin v podobě gigas efektu a navýšení produkce sekundárních metabolitů (Berkov & Philipov, 2002; Bharati, Fernández, et al., 2023; Ownbey, 1950). Dále lze polyploidii použít jako nástroj pro obnovu fertility sterilních kříženců (Zlesak et al., 2005), nebo naopak využít sterilitu rostlin jako nástroj pro tvorbu bezsemenných plodin (Henderson, 1977). Neméně významný je potenciál zvýšené odolnosti vůči biotickým (patogeny) i abiotickým stresorům (sucho, zasolení) (Dhooghe *et al.*, 2011; Šedivá *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2022).

Jelikož jsou životaschopní polyploidní živočichové především obojživelníci a ryby, hlavními odvětvími, které užívají metod polyploidní indukce, jsou akvakultura a rybářský průmysl (Fankhauser, 1945; Purdom, 1972). I zde je hlavním důvodem zvýšený růst rybích jedinců (S. Liu et al., 2001). Doprovázená sterilita je tu vítanou vlastností, a to nejen jako ekologická ochrana před šířením modifikovaných organismů, ale také jako úspora energie daných jedinců. Energie, která by byla jinak využita pro tvorbu rozmnožovací soustavy (především pro rozvoj gonád u samic) tak může být přesunuta do tvorby svaloviny (Benfey & Sutterlin, 1984; Jung et al., 2026; Purdom, 1972).

V praxi se k indukci polyploidie využívá široké spektrum postupu, které lze podle jejich mechanismu účinku rozdělit na metody fyzikální a chemické, jejichž aplikací vznikají především triploidní nebo tetraploidní jedinci (například Valenti, 1975; Jung *et al.*, 2026).

3.1 Fyzikální metody indukce polyploidie

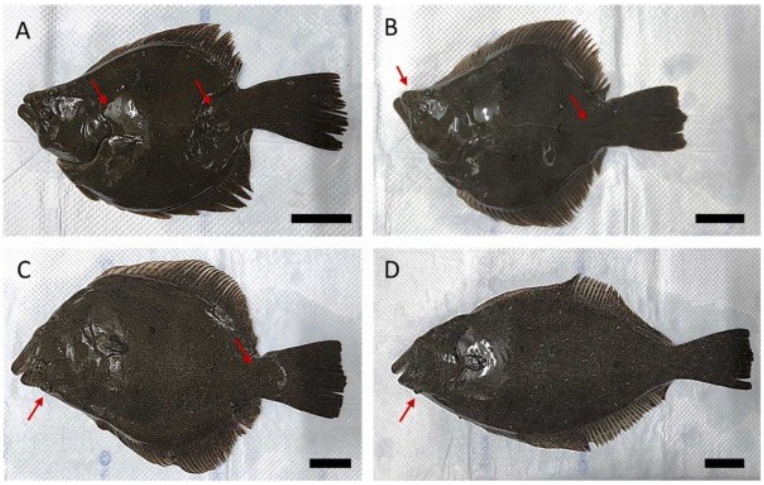
Fyzikální indukce polyploidie je založena na působení enviromentálních stresů, zejména tlakových a teplotních šoků, které narušují buněčné dělení (Dasgupta, 1962; Chourrout, 1984; Valenti, 1975). Ačkoli obecně je umělá indukce polyploidie využívaná spíše pro rostliny, fyzikální šoky se aplikují primárně u živočichů (obzvláště u hospodářských využívaných ryb), a to přímým ošetřením čerstvě oplozených zygot (Dasgupta, 1962; Solar et al., 1984; Valenti, 1975). Naopak u rostlin se fyzikální šoky používají méně často, ale mohou působit na generativní orgány, kde indukují meiotické poruchy vedoucí k tvorbě neredukovaných gamet zárodečného vaku (Guo et al., 2017) nebo pylu (Q. Zhou et al., 2022).

3.1.1 Hydrostatický tlak

Hydrostatický tlak patří mezi nejúčinnější fyzikální metody, zejména u živočichů (Benfey & Sutterlin, 1984; Dasgupta, 1962). Expozice oplozených vajíček tlaku o cca 400–680 atm depolymerizuje mikrotubuly a blokuje dělicí vřeténko. Aplikace ihned po oplození potlačí uvolnění pólového tělíska, díky čemuž se z embryí stanou triploidi (Dasgupta, 1962). Naopak pozdější blokace prvního dělení buňky způsobí indukci tetraploidie (Chourrout, 1984; Myers et al., 1986). Metoda však vyžaduje nákladnou aparaturu a extrémně přesné načasování. Odchylky v expozici totiž vedou k mozaikovitému rozložení polyploidních buněk v tkáních, nestabilním aneuploidům, masivnímu úhynu či těžkým deformacím (Dasgupta, 1962; Jung et al., 2026).

3.1.2 Teplotní šoky

Tepelné a chladové šoky tvoří jednodušší, avšak hůře kontrolovatelnou, alternativu. U živočichů extrémní teplo denaturuje vřeténko a chlad inhibuje anafázi II (Cassani & Caton, 1986; Valenti, 1975). U rostlin tepelný stres blokuje přechod do meiózy II (mj. snížením exprese cyklinu *PtCYCA1;2*; Zhou *et al.*, 2022), kdežto chlad narušuje uspořádání mikrotubulů v telofázi II (De Storme et al., 2012). Oproti hydrostatickému tlaku jsou teplotní šoky méně spolehlivé a jejich účinek je variabilnější. Velice časté jsou vedlejší efekty, jako je zvýšená mortalita, zpomalený růst, mozaicismus nebo morfologické deformace. Zvýšení účinnosti (například prodloužením expozice) navíc obvykle výrazně snižuje životaschopnost jedinců (Gillespie & Armstrong, 1979; Jung et al., 2026; Solar et al., 1984).



Obr. 3: ***Morfologické deformace u platýse olivového po indukci tetraploidie chladovým šokem***
(Jung et al., 2026)

3.1.3 UV záření

Účinek ultrafialového (UV) záření se liší podle typu organismu. U živočichů slouží k inaktivaci otcovské DNA při gynogenezi, po níž může následovat obnova ploidie tlakovým šokem (Gillespie & Armstrong, 1979; Chourrout, 1984). U rostlin působí solární UV-B záření (280–315 nm) jako silný stresor poškozující DNA tvorbou pyrimidinových dimerů (Zedek et al., 2020). Zasažené buňky na něj

reagují endopolyploidizací, která vede ke zvětšení buněk a zvýšené odolnosti vůči záření (Hase et al., 2006; Yamasaki et al., 2010).

3.2 Chemické metody indukce polyploidie

Indukce pomocí chemických činidel je dnes primárním přístupem pro umělé navození polyploidního stavu, a to především v *in vitro* podmínkách. Hlavní skupinou užívaných látek jsou antimitotická činidla, která cílí na blokaci mikrotubulárního aparátu dělicího vřeténka (Morejohn et al., 1987). Mechanismus spočívá v aplikaci chemických látek, které interferují s buněčným cyklem, narušují jeho průběh a přirozenou karyo- i cytokinezi, kdy buňka přechází do interfáze s již duplikovanou genetickou informací (Zhang *et al.*, 2007; Castro, Castro a Loureiro, 2018). Většina chemických indukcí se využívá pro umělé zvýšení ploidní úrovně rostlin. U živočichů jsou tyto metody často limitovány vysokou toxicitou, a to již při nízkých dávkách, anebo velmi slabou, případně žádnou, afinitou účinné látky vůči živočišným tubulinům (Allen & Stanley, 1979; Morejohn et al., 1987).

Chemické ošetření může probíhat *ex vitro* (respektive *in* vivo) aplikací účinných látek přímo na rostlinu, nejčastěji na klíčící semena (Berger & Witkus, 1943), semenáčky (Ntuli & Zobolo, 2010), vzrostné vrcholy a pupeny (Luckett, 1989). Tento postup je sice technicky méně náročný, ale produkuje větší množství chimér, jejichž separace je obtížnější než při indukci za *in vitro* podmínek (Zhang et al., 2007). Hlavní komplikaci představuje nerovnoměrná expozice činidla, které musí překonat několikavrstevný meristém, tj. tuniku a korpus (Zlesak et al., 2005). Práce *in vitro* vyžaduje přísné udržení sterility, umožňuje však efektivnější a kvalitnější výstupy. (Allum et al., 2007; Luckett, 1989). Činidla se aplikují na specifické části rostliny pěstované na živém médiu. Menší homogenní explantáty lze máčet do tekutého činidla, které pak k buňkám proniká rovnoměrně. Typicky se jedná o nodální segmenty (Bharati, Fernández, et al., 2023), vzrostné vrcholy (Thao et al., 2003), pupeny (Kermani et al., 2003), kalusové kultury a embrya (Sakhanokho et al., 2009).

3.2.1 Oxid dusný

Na pomezí fyzikální a chemické indukce polyploidizace stojí oxid dusný (N_2O). I když je oxid dusný z chemické podstaty plynou látkou a v literatuře je běžně řazen mezi standardní chemická polyploidizační činidla (Younis, Hwang a Lim, 2013). Jeho samotná aplikace a účinnost jsou neoddělitelně podmíněny fyzikálním faktorem, kterým je vysoký tlak (Arshad et al., 2023; Taylor et al., 1976).

Pro dosažení antimitotického účinku je potřeba exponovat cílová pletiva, například semenáčky nebo odříznutá květenství, oxidu dusnému v hermeticky utěsněných tlakových komorách. Proces probíhá obvykle pod tlakem od 0,6 MPa, což odpovídá 6 barům atmosférického tlaku (1 atm ≈ 1 bar ≈ 0,1 MPa), případně až 10 barů po dobu 12-36 hodin. Zvýšený tlak umožňuje efektivní difúzi plynu do buněk a následnou blokaci mitotického aparátu (Taylor et al., 1976).

Plynné skupenství s sebou přináší mnoho praktických výhod. Jednou z nich je precizní kontrola síly, doby trvání i načasování expozice a zaručení rovnoměrného a rychlého průniku látky do pletiv. Tato metoda je tak vhodná pro masovou aplikaci, kdy je možné ošetřit 500 až 1000 semenáčků za den, a to s dosažením velmi kvalitních a konzistentních výsledků (Kato & Geiger, 2002). Srovnávací experimenty na haploidních liniích pšenice ukázaly, že účinnost této metody je shodná s aplikací kolchicinu, avšak při zásadně menší toxicitě. Zatímco 0.01% kolchicinový roztok způsobil usmrcení 15% exponovaných rostlin, ošetření oxidem dusným nevyvolalo v porovnání s kontrolní skupinou žádné toxické symptomy (Hansen et al., 1988).

Metoda však představuje i mnoho rizik, které mohou ohrozit kvalitu explantátů. Značné komplikace představuje několika denní inkubace v uzavřených komorách za podmínek zvýšené vlhkosti a absence světla, které mohou rostliny ohrozit spontánní houbovou infekcí (Kato & Geiger, 2002). Nebezpečný je i neadekvátně vysoký tlak vedoucí k rozptylu chromozomů do cytoplazmy a tvorbě nežádoucích mikrojader. Nelze opomenout ani riziko vzniku růstových abnormalit, jako jsou zakrnělé stonky či deformované listy, případně tvorba aneuploidů (Taylor et al., 1976). Omezujícím faktorem (logistickým i ekonomickým) opět zůstává potřeba velkoobjemových tlakových komor, podobně jako při indukci hydrostatickým tlakem (Arshad et al., 2023).

3.2.2 Kolchicin a jeho deriváty

3.2.2.1 Kolchicin

Nejčastěji používaným polyploidizačním činidlem v současné vědecké praxi je kolchicin, původně rostlinný alkaloid ocúnu jesenního (*Colchium autumnale*). Kolchicin se váže na protein tubulin, což způsobuje inhibici tubulinové polymerizace a následné narušení průběhu mitózy (například Morejohn *et al.*, 1987; Bae *et al.*, 2020).

Přesný mechanismus interakce kolchicinu a tubulinového proteinu spočívá ve vazbě na dvě vazebná místa. Primární vazebné místo (PBS) zahrnuje aminokyseliny v bezprostřední vzdálenosti 4,5 Å (1 Å ≈ 0,1 nm) a je strukturně podpořeno vazbou v rozšířené vazebné oblasti (EBS) zahrnující i residua okolních aminokyselin ve vzdálenosti až 5,0 Å od PBS. Senzitivitu a sílu vazby určuje celková architektura vazebné kapsy a značně se tak liší, pokud je v místě této aminokyselinové sekvence nějaká modifikace. To lze ukázat na rozdílné přilnavosti kolchicinu k rostlinnému a živočišnému tubulinu, která pravděpodobně spočívá ve zmíněné záměně aminokyselin v β-tubulinových podjednotkách. Konkrétně se jedná o substituci v pozici 250 a 270, kde živočišný tubulin nese alanin (250) a prolin (270), zatímco rostlinný tubulin obsahuje serin (250) a valin, případně izoleucin (270). Příčinou těchto strukturních změn je až 10 000krát silnější vazba kolchicinu vůči živočišným tubulinům v porovnání s rostlinami a houbami (Banerjee et al., 2007; Morejohn et al., 1984). Při kolchicinovém ošetření rostlin je tak nutné aplikovat řádově vyšší koncentraci činidla, aby se dosáhlo podobného efektu jako u živočichů (Berger & Witkus, 1943; Morejohn et al., 1984).

O procesu dělení buněk při účincích kolchicinu je referováno jako o C-mitóze, specifickém typu mitózy, charakteristickým markantními fyzikálními i ultrastrukturálními změnami uvnitř buňky. Kolchicin brání vzniku funkčního dělicího vřeténka a zpožďuje dělení centromer v oblastech druhotného spojení (Berger & Witkus, 1943; Levan, 1938). Tento zásah do normálního průběhu buněčného cyklu vede k uvíznutí buňky v konkrétní fázi mitózy, obvykle v metafázi (Levan, 1938; Castro, Castro a Loureiro, 2018). V rámci sekundárních účinků se tvoří tzv. diplo-chromozomy, dříve označované jako c-páry. Jedná se o chromozomální útvary, kde jsou sesterské chromatidy oddělené po celé délce, ale kvůli zpoždění dělení centromer jsou stále fyzicky propojené v SA-oblasti (scaffold attachment regions). Diplochromozom se tedy skládá ze čtyř sesterských chromatid namísto dvou (Berger & Witkus, 1943; Levan, 1938). Dalším projevem je extrémní kondenzace chromozomových ramen a vznik restitučních jader. Ta se formují v důsledku blokace pohybu chromozomů k pólům a zamezení cytokineze. Kolem replikovaných chromozomů soustředěných ve středu buňky se poté vytvoří nová jaderná membrána (Berger & Witkus, 1943; Inoué & Sato, 1967).

Navzdory dlouhé tradici využívání kolchicinu, se doposud nepodařilo zjistit, proč eukaryota disponují vazebnými místy pro tuto chemickou látku, se kterou se ve volné přírodě běžně nesetkají (Banerjee et al., 2007).

Významná role kolchicinu při syntetické indukci polyploidie byla historicky potvrzena rozsáhlým množstvím odborných studií, jeho aplikace však představuje i řadu rizik a omezení. Zásadním problémem je samotná manipulace s látkou, jelikož alkaloid je zřejmě vysoce toxický a karcinogenní, a jeho použití tak může být lidskému zdraví nebezpečné (například Morejohn *et al.*, 1984; Arshad *et al.*, 2023).

Toxicita se také negativně odráží na životaschopnosti ošetřených pletiv a buněk. Často je pozorována souvislost nárůstu letality se zvyšující se koncentrací a dobou expozice. (Väinölä, 2000; Castro, Castro a Loureiro, 2018; Le-Feuvre et al., 2021). Dalším nežádoucím účinkem je výskyt mutačních efektů, včetně chromozomových ztrát, či aberací (Luckett, 1989). Indukovaní polyploidi navíc často vznikají v mixoploidním stavu jako tzv. chiméry (Thao et al., 2003). Tato mixoploidní stádia bývají velice nestabilní a je u nich patrná tendence návratu k původnímu stavu, tj. nižší ploidii (Stanys et al., 2006).

3.2.2.2 Demekolcin

Nejvýznamnějším a zároveň méně toxickým derivátem kolchicinu je demekolcin, neboli N-methyl-N-desacetyl kolchicin, známý pod komerčním názvem Colcemid. Podobně jako kolchicinu ovlivňuje tato látka dynamickou rovnováhu mikrotubulárních proteinů dělicího vřeténka. Při nízkých koncentracích indukuje kontrakci vedoucí k translokaci chromozomů k povrchu buňky, avšak při vyšších koncentracích způsobuje rychlý kolaps vřeténka již během několika minut. Derivát se ukázal být efektivnějším činidlem při aplikaci na zvířatech. Ošetření demekolcinem u bezobratlých živočichů jako

jsou ježovky, hvězdice a kroužkovci, úspěšně blokovalo časné rýhování embryí (Aronson & Inoué, 1970; Inoué & Sato, 1967).

V porovnání s kolchicinem se demekolcin jeví jako efektivnější inhibitor i při nižších koncentracích a jeho účinky jsou zcela reverzibilní. Unikátní vlastností je také jeho citlivost na světlo, která se dá využít jako účinný prostředek fotochemické inaktivace pro snadnější kontrolovatelnost (Aronson & Inoué, 1970; Inoué & Sato, 1967; Kwak et al., 2017).

3.2.3 Dinitroaniliny

Chemická činidla řazená k dinitroanilinům představují skupinu syntetických látek, s primárním uplatněním v zahradnictví jako preemergentní herbicidy pro hubení klíčících semen plevele. Rovněž ale patří k účinným antimitotickým činidlům aplikovaným pro indukci polyploidie. Fungují jako inhibitory mitózy, které se však na rozdíl od kolchicinu vážou vůči rostlinným tubulinovým proteinům mnohem silněji ve srovnání s živočišnými tubuliny, díky čemuž představují bezpečnější alternativu činidla (Morejohn *et al.*, 1987; Dostál a Libusová, 2014).

3.2.3.1 Oryzalin

Oryzalin, neboli 3,5-dinitro-N4,N4-dipropylsulfanilamide, slouží jako velice významné antimitotické činidlo hojně užívané pro umělou indukci polyploidie především u vyšších rostlin (Bharati, Fernández, et al., 2023). Jedná se o běžně používaný dinitroanilinový herbicid se silnou vazebnou afinitou přednostně k rostlinnému tubulinu, díky které si vysloužil označení „kolchicin rostlinné říše“ (Bajer a Molè-Bajer, 1986; Kermani *et al.*, 2003; Dostál a Libusová, 2014).

Obdobně jako u zmíněného alkaloidu, oryzalinu stabilizuje tubulinovou vazbou v jeho nepolymerizovatelné formě, čímž posouvá rovnováhu k depolymerizaci mikrotubulů a způsobuje kolaps dělicího vřeténka (Morejohn et al., 1987). Vazebné místo se pravděpodobně nachází přímo na α- podjednotce v blízkosti rozhraní mezi dimery, přesná lokace však doposud nebyla určena (Dempsey et al., 2013).

Díky své selektivitě k rostlinnému tubulinu a minimální afinitě k živočišným tubulinům je oryzalin bezpečnější a manipulace s ním je tak výrazně méně riziková pro lidské zdraví (Morejohn et al., 1984). Pro navození polyploidie se navíc používají roztoky s mnohonásobně nižšími koncentracemi, obvykle v řádu mikromolárních množství, zatímco při ošetření kolchicinem jsou běžně zapotřebí roztoky o koncentracích milimolárního rozmezí (Bharati, Fernández, et al., 2023; Kermani et al., 2003). Je však důležité zdůraznit, že účinky i tohoto herbicidu naznačují existenci horní prahové hodnoty, nad kterou se schopnost indukce polyploidie ztrácí. Toto omezení bylo pozorováno ve studii na kdoulci japonském (*Chaenomeles japonica*), kde bylo prokázáno, že při koncentraci 144 μM se indukční efekt vytrácí, aniž by se současně projevila toxická zátěž a stoupla míra mortality explantátů (Stanys et al., 2006). Zároveň bylo zjištěno, že indukce roztokem o nižší koncentraci, konkrétně 30 μM, může stimulovat somatickou

embryogenezi u vzácného druhu epifytické zázvorníkovité rostliny *Hedychium muluense* (Sakhanokho et al., 2009).

Výsledky mnoha srovnávacích studií konstantně prokazují vyšší efektivitu při použití oryzalinu nad kolchicinem, a to jak z hlediska účinnosti indukce znásobení genomu, tak v kvalitě a míře přežití rostlinných explantátů. Například u *Watsonia lepida* vedlo nejefektivnější ošetření, tj. 120 μM oryzalinem po dobu 24 hodin, k přežívání 30 % ošetřených rostlin, z nichž 33 % tvořily stabilní tetraploidi. Zatímco při stejně dlouhé expozici 25 mM kolchicinu bylo dosaženo 84% přežívání, ale zcela bez produkce stabilních tetraploidních jedinců, pouze nestabilních mixoploidních stádií (Ascough et al., 2008). Podobné výsledky ukázala i aplikace obou antimitotických činidel u *Alocasia mischolitziana*, kde ošetření 0,01% oryzalinem po dobu 24 hodin vedlo k indukci 15,4% tetraploidů, zatímco vystavení 0,1% kolchicinu zapříčinilo úhyn všech explantátů. Při aplikaci nižších koncentrací opět vznikaly mixoploidní rostliny, u kterých byly, vyjma nestability, pozorovány také morfologické změny ve formě deformace listů (Thao et al., 2003).

Trifluralin

Dalším běžně užívaným polyploidizačním činidlem ze skupiny dinitroanylinů je herbicid trifluralin, nebo také α, α, α-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidin. Podobně jako oryzalin se trifluralin přímo váže na rostlinný tubulin, blokuje tak přechod do anafáze buněčného cyklu a spouští c-mitózu, tj. mitózu pod vlivem kolchicinu nebo podobných látek (Hlaing et al., 2021; Morejohn et al., 1987). Podobně jako jiná antimitotika i trifluralin může vyvolávat vznik periklinárních chimér, tedy jedinců mixoploidního charakteru, u nichž ke zdvojení chromozomové sady dochází pouze v určitých meristematických vrstvách, zatímco v ostatních pletivech je zachována původní úroveň ploidie (Zlesak et al., 2005). Praktickými nevýhodami trifluralinu jsou tendence adsorbovat na skleněné povrchy a jeho nízká rozpustnost ve vodných roztocích, což je často důvodem pro jeho nahrazení oryzalinem (Morejohn et al., 1987). Z hlediska efektivity však poskytuje vysokou míru přežití zasažených explantátů a celkově spolehlivou produkci stabilních polyploidů. K hlavním praktickým výhodám při šlechtitelství patří snadná komerční dostupnost a také možnost aplikace přímo na klíčící semenáčky *ex vitro.* Tento postup tak umožňuje generovat polyploidy bez potřeby finančně a technicky náročného vybavení pro rostlinné tkáňové kultury (Zlesak et al., 2005).

3.2.3.2 Další dinitroaniliny

Kromě oryzalinu a trifluralinu existuje celá řada funkčních látek spadajících do skupiny dinitroanilinů, které se projevují jak herbicidními, tak antimitotické účinky, a lze je tak využít i pro syntézu polyploidů. Mimo jiné se jedná o pendimethalin, ethalfluralin, benfluralin, profluralin, fluchofloralin, či prodiamin, dinitriamin, isopropalin nebo nitralin. Tyto látky mají stejný mechanismus účinku, ale v kontextu indukce polyploidie se objevují jen zřídka (Ma *et al.*, 2010; Dostál a Libusová, 2014).

3.2.4 Kofein

Kofein je další chemický agent, který se v rostlinných biotechnologiích využívá k indukci polyploidie. Jeho účinek se však zásadně liší od klasických antimitotických látek, protože neinhibuje dělicí vřeténko ani neinterferuje s karyokinezí, ale blokuje přímo cytokinezi. Po skončení mitózy zabraňuje ukládání polysacharidu kalózy, což narušuje přirozené formování buněčné přepážky a zároveň ovlivňuje uchycení a dynamiku mikrotubulárního aparátu v centrální oblasti fragmoplastu (Broughton et al., 2020; Yasuhara, 2005). Důsledkem tohoto procesu je vznik jedné buňky se dvěma jádry. Tato jádra mohou díky zachování vzájemné synchronie v následném buněčném cyklu fúzovat a společně vstoupit do dalšího kola mitózy. Tímto procesem může vzniknout stabilní polyploidní buňka (Giminez-Martin et al., 1968; Thomas et al., 1997).

Kofein je vhodný pro *ex vitro* i *in vitro* aplikaci a často se užívá v kombinaci s taurinem (směs CAF-T), který působí jako silný antioxidant a napomáhá tak snížení toxických reaktivních forem kyslíku (ROS). Stabilizací buněčné membrány dodatečně snižuje toxicitu a oxidativní stres pletiv. Ošetření kofeinem představuje velice šetrnou a cenově dostupnou variantu spolehlivého polyploidizačního činidla. Jeho aplikace pro člověka není zdraví nebezpečná ani karcinogenní a vede k významně nižšímu riziku vzniku morfologických či chromozomových aberací (Arshad et al., 2023; Thomas et al., 1997). Některé studie také ukázaly, že u konkrétních genotypů dokáže v *in vitro* podmínkách stimulovat embryogenezi a regeneraci (Broughton et al., 2020).

Zásadním limitujícím faktorem je nízká efektivita v porovnání s jinými antimitotiky, například kolchicinem. Pro zajištění stability polyploidie kmenových buněk apikálních meristémů je totiž zapotřebí vícenásobný zásah, tedy opakované cílení na stejné buňky během několika po sobě jdoucích buněčných cyklů. Důsledkem je tendence tvorby plošně pouze velmi malých polyploidních oblastí (Thomas et al., 1997).

O užití kofeinu u živočichů existuje minimum dostupných zdrojů a obvykle se jedná o kombinovanou aplikaci kofeinu a fyzikálních šoků. Kofein u živočichů způsobí narušení mikrotubulů dělicího aparátu a následné zamezení uvolnění pólového tělíska (Durand et al., 1990). Příkladem může být studie na perlotvorce japonské (*Pinctada fucata martensii*), u kterého byla indukována polyploidizace prostřednictvím kofeinového roztoku doprovázeného zvýšenou teplotou (31,5 °C). Tento experiment sice úspěšně indukoval polyploidii, avšak z důvodu chybějící kontrolní skupiny (ošetřené pouze teplem), nelze skutečnou efektivitu samotného kofeinu jednoznačně potvrdit (Durand et al., 1990).

3.2.5 Fosforthioimidáty

První základní skupinou chemických látek spadajících do antimitotických činidel jsou fosforthioimidáty, především amiprofos-methyl (AMP) a butamifos (BUT). Fosforthioimidáty jsou antimitotické herbicidy, které narušují mikrotubulární dynamiku během metafáze prostřednictvím specifické vazby na rostlinný tubulin (Dostál a Libusová, 2014). Interakce činidel s proteinem blokuje rozchod

sesterských chromatid a zastavuje tak buněčné dělení. Výsledkem jsou buňky se zdvojenou chromozomovou sadou. Tato metoda je relevantní především pro *in vitro* ošetření rostlinných materiálů, například semen, vajíček nebo haploidních kalusů (Hlaing et al., 2021; Wan et al., 1991). Explantáty je třeba inkubovat v tekutých či pevných médiích obohacených o účinné látky. Studie také ukázaly schopnost AMP stimulovat organogenezi, což umožňuje aplikaci AMP přímo na semenáčky pro indukci tvorby adventivních výhonů bez potřeby přidání exogenního rostlinného stimulátoru (Hlaing et al., 2021).

Hlavní výhodou fosforthioimidátů je jejich vysoká účinnost již při nízkých dávkách a také jejich šetrnost k fertilitě a regenerační schopnosti rostlinných pletiv (Wan et al., 1991). Díky své inertnosti vůči živočišným tubulinům jsou také výrazněji bezpečnější při manipulaci v porovnání s často užívanými činidly alkaloidního charakteru (Morejohn & Fosket, 1984).

Negativním aspektem je finanční náročnost ve srovnání s jinými chemickými činidly a dále omezená dostupnost v mnoha asijských a afrických zemích (Arshad et al., 2023).

3.2.6 Karbamáty

Mnohé studie řadí do skupiny antimitotických činidel k indukci polyploidie i propham (IPC) nebo chlorpropham (CIPC), spadající mezi karbamáty. Podobně jako typická výše zmíněná činidla, i tyto látky inhibují dělení buňky v metafázi. Na rozdíl od klasických antimitotik se nevážou na samotné mikrotubuly a nezpůsobují jejich depolymerizaci. Mechanismus účinku těchto látek je spíše fyzický. Karbamáty narušují a fragmentují mikrotubulární organizační centra (MTOC). Dělicí vřeténko se tak sice nerozpadá, ale jeho dezorganizace způsobuje multipolární dělení, zpožděnou separaci chromozomů a abnormální tvorbu buněčné přepážky. Výsledkem však nebývají jen požadované buňky se znásobenými chromozomovými sadami, ale i dceřiné buňky s vícečetnými jádry (Hidalgo *et al.*, 1989; Dhooghe *et al.*, 2011).

Přestože se tato metoda, obdobně jako např. dinitroaniliny nebo kofein, řadí k bezpečnějším, její efektivita je značně nízká. Studie na kořenových meristémech cibule (*Allium cepa*) dokonce přinesly zcela negativní výsledky co se indukce polyploidie týče. Ošetření IPC i CIPC produkovalo výhradně buňky s mikrojádry, ze kterých vznikly dalším dělením aneuploidi. Žádné funkční polyploidní buňky nebyly po ošetření detekované (Hidalgo et al., 1989). Obdobných výsledků dosáhl i experiment na hlevíku (*Antirrhinum majus*). I tato studie prokázala nulovou účinnost při indukci tetraploidních rostlin a adventivních výhonů, avšak potvrdila souvislost rostoucí koncentrace činidel s narůstající mortalitou (Hlaing et al., 2021).

3.2.7 Benzimidy

Další skupinou antimitotik jsou benzamidy, především herbicid pronamid (také propyzamid) a jeho deriváty (Dhooghe *et al.*, 2011; Arshad *et al.*, 2023). Užívají se zejména v *in vitro* podmínkách

a podobně jako ostatní antimitotická činidla vykazují velmi vysokou afinitu k rostlinnému tubulinu. Na rozdíl od nich však mikrotubuly zcela nedepolymerizují, ale vyvolávají zkrácení tubulárních vláken (Vaughan & Vaughn, 1987; Wan et al., 1991).

Pronamid představuje výrazně bezpečnější variantu účinnou již při nízkých koncentracích. Experimentální studie na haploidních kalusech kukuřice ukázala, že aplikace 5 až 10 μM pronamidu způsobí úspěšné navození diploidního charakteru u 70 % rostlin. Navíc, na rozdíl od oryzalinu či trifluralinu, u pronamidu nebyla zaznamenána silná inhibice růstu ani snížení regenerační schopnosti ošetřených pletiv (Wan et al., 1991).

3.2.8 Cytochalasin B

Ošetření antimitotikem cytochalasinem B se experimentálně využívá jako jedna z metod, pro chemické navození polyploidie u živočichů, nejčastěji u hospodářsky významných ryb (Allen & Stanley, 1979; Refstie et al., 1977).

Tato látka neblokuje dělení jádra ale cytokinezi, tedy fyzické rozdělení buněk, narušením mikrofilament. Cytochalasin B se aplikuje pomocí vodného roztoku přímo na oplozené jikry. Nutností je správné načasování a délka expozice, která značně ovlivňuje výsledky (Carter, 1967). Experimenty naznačují, že ideální ošetření musí začít v určitou dobu po oplození a skončit zhruba ve stádiu čtyř buněk, okamžitá aplikace je pro jikry stoprocentně letální (Refstie et al., 1977). Ošetření již v rané fázi během uvolnění pólového tělíska, vede k indukci triploidů, zatímco blokace mitotického rýhování produkuje tetraploidy (Allen & Stanley, 1979).

Experimentálně ošetření jednici vykazují sterilitu, která je však v akvakultuře a rybářském průmyslu považována spíše za výhodu. Dospělci investují metabolickou energii pro vývoj pohlavních orgánů do somatického růstu a sterilita tak zajišťuje vysokou kvalitu masa a urychlení produkce. Značné omezení představuje vysoká toxicita a četnost mozaicismu. Cytochalasin B neindukuje celistvé polyploidy, pouze nepravidelné mozaiky v podobě organismů se směsí diploidních a triploidních či tetraploidních buněk v rozmezí 1 % až 58 % (Allen & Stanley, 1979; Refstie et al., 1977).

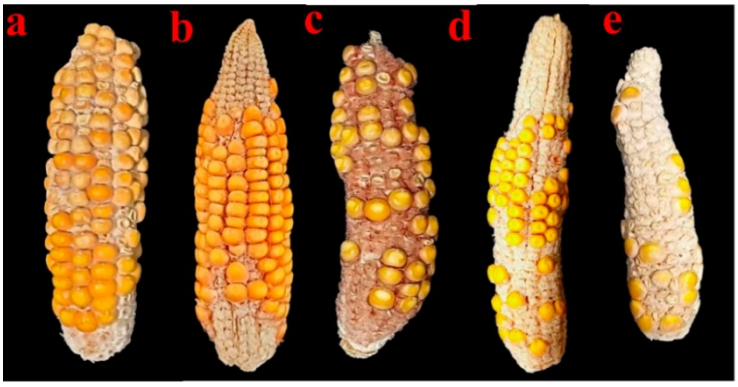
Je zajímavé, že u savců je aplikace cytochalasinu B omezena výhradně na *in vitro* podmínky, a to především pro experimentální účely. Cytochalasin B byl úspěšně využit k indukci triploidie a tetraploidie u myších preimplantačních embryí (Snow, 1973) či k produkci čistých tetraploidních klonů z lidských diploidních fibroblastů (Hoehn et al., 1973). V komerční marikultuře se uplatňuje při polyploidizaci mlžů, například ústřic a japonských perlotvorek (*Pinctada fucata martensii*), za účelem produkce sterilních triploidních larev. Jelikož však ošetření cytochalasinem B způsobuje abnormality v chování chromozomů během meiózy, je obvykle nahrazeno jinými postupy, například fyzikálními šoky (Durand et al., 1990).

3.2.9 Další chemická činidla

Kromě nejběžněji užívaných inhibitorů buněčného dělení se v experimentální praxi uplatňují i další specifické látky. Mezi ně patří například epoxomicin (Dhooghe *et al.*, 2011), aromatický uhlovodík acenaftan (Levan, 1940), deriváty pyridinu nebo paklitaxel či jiné komplexní rostlinné deriváty (Dostál a Libusová, 2014).

Avšak bez ohledu na zvolené chemické činidlo, se všechny tyto metody potýkají s problematikou vysoké mortality a tvorby nestabilních chimérických organismů. Úspěšná polyploidizace tak představuje kompromis mezi efektivitou daného činidla a jeho toxicitou. Proto je optimalizace koncentrací i doby expozice pro každé činidlo i zkoumaný druh nutností (Zlesak, Thill a Anderson, 2005; Dhooghe *et al.*, 2011).

Zásadní limitací všech chemických ošetření rostlin je buněčná stěna, která tvoří fyzikální bariéru a stěžuje činidlům průstup do nitra buněk (Ascough et al., 2008). Pro usnadnění pronikání chemikálií přes buněčnou stěnu se rutinně využívají dodatečné látky, z nichž nejznámější je dimethylsulfoxid (DMSO). Chemické přenašeče se v nízkých koncentracích, nejčastěji kolem 1 % – 2 %, přidávají do roztoku činidla. Častým doplňkem bývají také surfaktanty neboli látky, které jsou povrchově aktivní a prokazatelně přispívají penetraci skrze bariéru a následnému zvýšení efektivity indukce (Bharati, Fernández, et al., 2023; Stanys et al., 2006; Väinölä, 2000).



Obr. 4: ***Vliv ošetření na produkci semen u dvojitých haploidů (DH) kukuřice seté***

a) smáčení sazenic v paklitaxelu (PTX) b) smáčení sazenic v kolchicinu (optimalizovaná metoda) c) smáčení semen ve směsi kofein-taurin (CAF-T) d) smáčení semen v paklitaxelu (PTX) e) kontrolní ošetření – smáčení sazenic v kolchicinu (standardní postup) (Arshad et al., 2023), upraveno autorem práce

3.2.10 Problém nedostatku protokolů

I když existuje mnoho protokolů, pro indukci polyploidie (využívajících především chemická antimitotika), jejich úspěšnost bývá velmi variabilní. Účinnost polyploidizace i konkrétních chemikálií je totiž druhově, a někdy dokonce i genotypově (odrůdově) silně specifická (Dhooghe *et al.*, 2011; Castro, Castro a Loureiro, 2018; Bharati, Fernández, *et al.*, 2023). Z těchto důvodu nelze publikované návody vnímat jako zaručené postupy pro indukci odlišných, přestože taxonomicky příbuzných, organismů. Úspěšná tvorba polyploidů u nových druhů tak často vyžaduje časově náročnou optimalizaci postupů (Dhooghe *et al.*, 2011; Bharati, Fernández, *et al.*, 2023). Obecný přehled navrhovaných indukčních činidel pro konkrétní skupiny organismů shrnuje *Tabulka 1*.

Značným omezením pro širší biologický výzkum je také nedostatek dat o indukci u planě rostoucích a modelových rostlin, například pro využití při ekologicko-evolučních experimentech. Drtivá většina dosavadní literatury a optimalizovaných protokolů se totiž primárně zaměřuje na rostliny se zemědělským a komerčním užitím a cílí na *in vitro* ošetření klonálně množených explantátů (Dhooghe *et al.*, 2011; Castro, Castro a Loureiro, 2018). U ekologických výzkumů je naopak žádoucí zachovaní přirozené genetické variability divokých populací a *ex vitro* ošetření. Obvykle se také pracuje s velkým množstvím vzorků různých genotypů (nejčastěji semena a semenáčky), u kterých je nutné zajistit synchronizovaný vývoj za stejných podmínek (Münzbergová 2017; Castro et al. 2018). I z těchto důvodu je využití umělé polyploidizace v ekologickém výzkumu v porovnání se zemědělstvím zatím pouze ojedinělé.

4 METODY DETEKCE POLYPLOIDIE

Úspěšnost indukce se následně ověřuje detekcí ploidie u ošetřených organismů. K tomu se běžně využívají kombinace tzv. přímých a nepřímých metod. Metody přímé jsou založené na principu hodnocení množství samotného genetického materiálu v buňce. Jsou přesnější, ale často bývají technicky i časově náročnější. Nepřímé metody naopak vychází z analýzy druhotných anatomických a morfologických znaků. Využívají tak znaků, které polyploidii běžně doprovázejí, jako je například zvětšená velikost buňky a jádra (Frandsen, 1968; Masterson, 1994).

4.1 Přímé metody detekce

4.1.1 Počítání chromozomů

Nejpřesnější, ale také nejnáročnější metoda je karyotypizace – přímé počítání chromozomů. Jde o pozorování dělících se buněk, typicky v metafázi, pod mikroskopem a počítání jednotlivých kondenzovaných chromozomů (*Dhooghe *et al.*, 2011). Preparáty se pro tyto účely fixují a barví barvivy, například Giemsou, Feulgenovou metodou nebo acetokarmínem (Jung et al., 2026; Thao et al., 2003).

U rostlinných preparátů se nejčastěji využívají meristémy kořenových čepiček (Chen et al., 2006; Thao et al., 2003). U živočichů pak například epitel regenerujících ploutví, případně u larev ocasní tkáň ploutviček (Fankhauser, 1945; Lemoine a Smith, 1980).

Tímto postupem lze odhalit nejen polyploidii, ale také aneuploidii. Přestože je tato metoda velice přesná, je zároveň značně zdlouhavá a u organismů s velkým množstvím malých chromozomů téměř nerealizovatelná (z důvodu špatné viditelnosti jednotlivých chromozomů a jejich případnému překryvu (Lemoine a Smith, 1980; Dhooghe *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2017).

4.1.2 Mikrospektrofotometrie a mikrofluorometrie

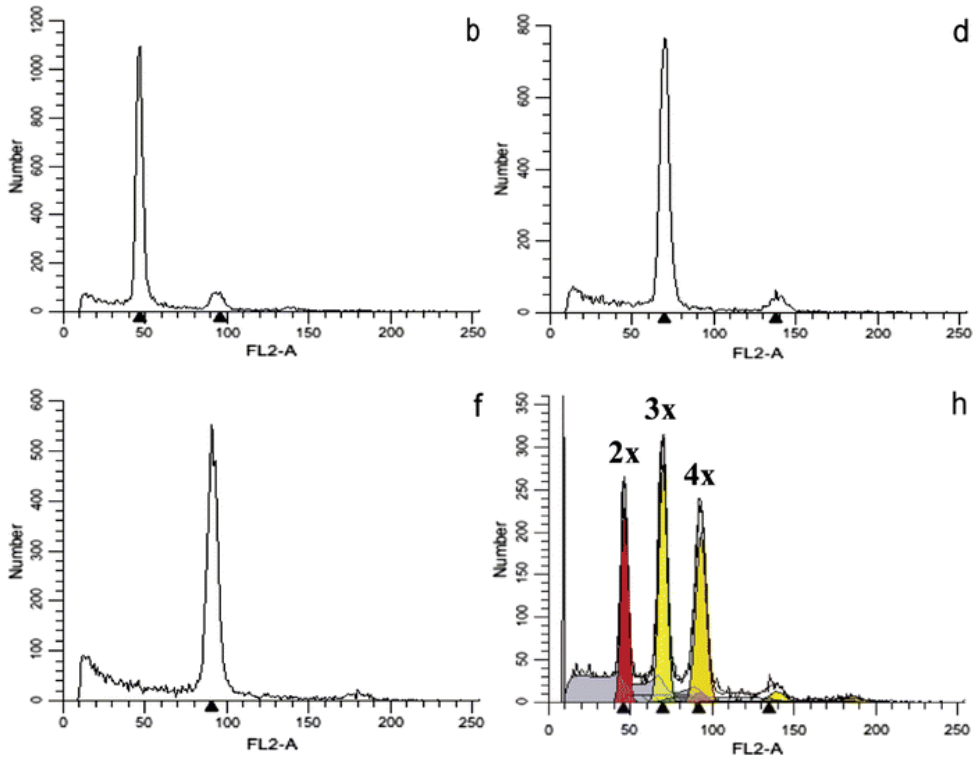
Tyto metody jsou založené na měření množství DNA kombinací technik mikroskopie a fotometrie. Detekuje se fluorescence nebo absorbance světla z fixovaných, tence nařezaných pletiv obarvených nejčastěji pomocí DAPI nebo Feulgenovou metodou (Chase & Tolloczko, 1987; Melaragno et al., 1993; Van Dilla et al., 1969). Tento postup je nejčastěji používán pro analýzu přesně definovaných buněk, například pro detekci endopolyploidie u pokožkových buněk a listových trichomů. Metoda je však časově velice náročná, a proto je pro celopopulační screening mnoha vzorků nevhodná (Melaragno et al., 1993).

4.1.3 Průtoková cytometrie

Mezi současně nejvyužívanější a nejefektivnější metodu patří průtoková cytometrie (angl. flow cytometry). Při průtokové cytometrii se nejprve izolují jádra, která se následně obarví specifickými fluorescenčními barvami (DeLaat et al., 1987; Van Dilla et al., 1969). Mezi nejčastěji používané fluorochromy patří především DAPI nebo propidium jodid (Kermani et al., 2003; Le-Feuvre et al., 2021).

Při samotné analýze prochází jednotlivá jádra kapilárou, kde jsou hydrodynamicky segregována do linie za sebou, aby nedocházelo k jejich překryvu. Suspenze je poté prozářena světelným zdrojem, nejčastěji laserem nebo UV zářením. Intenzita fluorescenčního signálu je elektronicky detekována a data jsou vyobrazena pomocí histogramů. Jednotlivé vrcholy tak ukazují intenzitu fluorescence, která je přímo úměrná obsahu obarvené DNA (DeLaat et al., 1987; Galbraith et al., 1991; Sakhanokho et al., 2009).

Hlavní výhodou průtokové cytometrie je masová analýza tisíce jader během několika vteřin. Metoda je tak ideální pro kvantitativní měření a zisk dostatečného množství dat pro statistickou analýzu. Další výhodou je možnost detekovat mixoploidii, která se projeví ve výsledném histogramu jako více samostatných píků. Limitující však mohou být náklady na vybavení a také zisk pouze relativního množství genetické informace (Sari, Abak a Pitrat, 1999; Thao *et al.*, 2003; Dhooghe *et al.*, 2011).



Obr. 5: ***Analýza pomocí průtokové cytometrie u topolu balzámového*** *b) diploid d) triploid f) tetraploid h) směsný vzorek diploidních, triploidních a tetraploidních jader (Guo et al., 2017), upraveno autorem práce*

4.1.4 Další molekulárně-genetické metody

Seznam výše zmíněných metod určených k detekci polyploidie přímo na základě analýzy DNA není úplný. Existuje mnoho dalších postupů, které užít. Mezi ně lze zařadit i PCR sekvenaci nebo RFLP markery. Tyto metody jsou velice detailní a umožňují tak konkrétní srovnání genetické informace jednotlivých organismů. Dále odhalí ztráty a zisky DNA úseků, změny v genové expresi, nebo fylogenetický původ polyploidních druhů (Gaut & Doebley, 1997; Ptacek et al., 1994; Song et al., 1995).

K detailnímu mapování chromozomů se v molekulární cytogenetice využívají také FISH sondy (fluorescenční *in situ* hybridizace). Fluorescenčně značené sondy jsou navázány na specifické sekvence DNA a jejich sledování tak umožňuje vizualizovat zdvojení chromozomů a odlišnosti jednotlivých chromozomových sad (například Arshad *et al.*, 2023).

4.2 Nepřímé metody detekce

4.2.1 Analýza morfologie epidermis

Překvapivě spolehlivou metodou pro odhalení polyploidie u rostlin je měření velikosti svěracích buněk průduchů. Rostlinná stomata se v důsledku polyploidie prodlužují a zvětšují. Morfologická změna průduchů bývá často doprovázena také snížením hustoty průduchů na jednotku plochy (Chen et al., 2006; Masterson, 1994; Sari et al., 1999). Experimentální studie Sakhanokho *et al.* (2009) potvrzuje

přesnost metody pro rychlé odhalení polyploidního stavu, avšak zdůrazňuje, že pro rozlišení mezi některými úrovněmi ploidie (například mezi triploidní a tetraploidní) není postup vždy dostatečně přesný.

Stomatální svěrací buňky lze také využít jako podkladový materiál pro porovnání množství chloroplastů. Polyploidie může být detekována analýzou počtu chloroplastů, který odráží množství genetické informace v buňce. Spolehlivost této metody byla podložena několika experimentálními studiemi, například u kukuřice (Ho et al., 1990), brambor (Frandsen, 1968), či topolů (Guo et al., 2017).

Hodnocení morfologie epidermis je metoda principiálně blízká analýze průduchů (stomat) u rostlin. Epidermální buňky živočichů, nejčastěji z ocasní ploutvičky ryb nebo larev obojživelníků, lze *in vivo* počítat a měřit. Mezi hlavní identifikátory polyploidie patří snížená hustota buněk, zvětšená interfázní jádra, ale také zvýšené množství jadérek (Fankhauser, 1945).

4.2.2 Pozorování gigas efektu

Celkovou morfologii jedinců lze v některých případech využít pro prvotní selekci, například během pěstování rostlin na poli nebo ve skleníku. Nejvíce viditelnými změnami bývají především zvětšené listy, květy a zkrácená internodia. Jde však pouze o orientační metodu, pro rychlé třídění ošetřených rostlin. Pro potvrzení úspěšné indukce je třeba následně využít přesnější metodou (Sari, Abak a Pitrat, 1999; Zhang *et al.*, 2007; Dhooghe *et al.*, 2011).

Pozorovatelné jsou také změny velikosti pylových zrn. Přestože je tato metoda překvapivě spolehlivá, je využívána jen zřídka kvůli nutnosti vyčkat, než rostliny dorostou do plně vyvinuté fertilní podoby (Ownbey, 1950; Taylor et al., 1976).

4.2.3 Analýza morfologie erytrocytů

Standardním nástrojem pro detekci polyploidie u živočichů představuje mikroskopické měření velikosti a objemu jader. U ryb a obojživelníků se k tomu nejčastěji využívají červené krvinky, které u nich, na rozdíl od savců, obsahují jádra (Lou & Purdom, 1984a; Valenti, 1975; X. Y. Zhou et al., 2008). Například u triploidních koljušek (*Gasterosteus aculeatus*) mají jádra triploidů v porovnání s diploidy 1,5krát větší objem (Swarup, 1959a, 1959b). Podobné výsledky ukázala i navazující studie u hybridních platýsů (kříženci *Pleuronectes platessa* a *Platichthys flesus*). Purdom (1972) ve svém experimentu naměřil přibližně 1,4krát zvětšenou plochu a 1,5krát větší objem eliptických jader u triploidních jedinců.

Možnou metodou k překonání časové náročnosti optické mikroskopie je použití elektronického počítače částic (například Coulter Counter). Tento přístroj umožňuje během několika vteřin změřit objemy desetitisíců erytrocytů a spolehlivě tak rozlišit polyploidii při masovém třídění. Metoda byla úspěšně užita kupříkladu při detekci tepelně a hydrostaticky indukované polyploidii u lososa obecného (*Salmon salar*; Benfey a Sutterlin 1984).

5 SKUPINY S ÚSPĚŠNĚ INDUKOVANOU POLYPLOIDIÍ

5.1 Syntetičtí polyploidi živočichů

U ryb se polyploidie indukuje nejčastěji u hospodářsky významných ryb pro navození sterility a s ní spojené úspory energie, která je investovaná do tělesného růstu. Úspěšně byla polyploidie indukována u ryb z čeledi lososovitých (Salmonidae) a kaprovitých (Cyprinidae). Jmenovitě se jedná o pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss/Salmo gairdneri*; Chourrout, 1984; Lou a Purdom, 1984), lososa obecného (*Salmo salar*; Benfey a Sutterlin, 1984), sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*; Lemoine a Smith, 1980) nebo kapra obecného (*Cyprinus carpio*; Gervai *et al.*, 1980) a karase stříbřitého (*Carassius auratus*; Liu *et al.*, 2001).

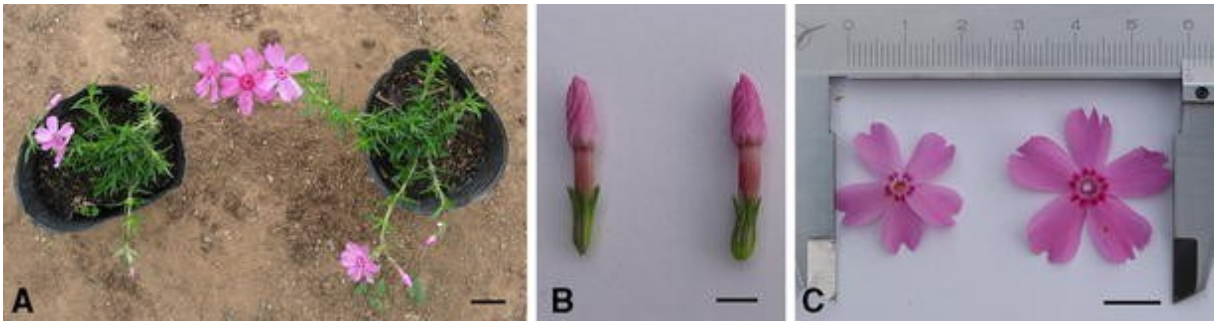
U obojživelníků byla polyploidie úspěšně indukovaná především u modelových organismů - na žábách (Dasgupta, 1962), mlocích a čolcích (Gillespie & Armstrong, 1979). U bezobratlých byla polyploidie indukována, u bource morušového (*Bombyx mori*; Kawaguchi, 1938), škeble *Mulinia lateralis* (Yang & Guo, 2006), žábronožky solné (*Artemia salina*; Gross, 1932) a několika dalších zástupců. Umělá indukce je u těchto organismů ale spíše pro experimentální než pro hospodářské účely.

U savců představuje přirozený výskyt polyploidie především anomálii, která obvykle není dlouhodobě životaschopná, pouze v raných fázích vývoje jedince. Umělá polyploidie byla však indukována i zde, například na prenatálních vajíčkách myši domácí (*Mus musculus*; Beatty a Fischberg, 1952). Ačkoli se povedlo polyploidii u embryí navodit, autoři předpokládají, že kvůli sníženému počtu buněk by byl jejich další vývoj pravděpodobně opožděn a zastaven.

5.2 Syntetičtí polyploidi rostlin

Na rozdíl od živočichů, produkce rostlinných syntetických polyploidů je v hospodářství a šlechtitelství hojně využívaná, a to zejména pro navození gigas efektu, zvýšené odolnosti a celkové produkci (například farmakologicky účinných látek). Indukce polyploidie u rostlin se využívá také pro překonání bariér při mezidruhovém křížení (Ascough, Staden a Erwin, 2008; Dhooghe *et al.*, 2011; Madani *et al.*, 2021). U zemědělských rostlin se polyploidizace tradičně využívá při šlechtění bezsemenných melounů (*Citrullus lanatus*), u kterých tato modifikace zvětšuje i tloušťku slupky plodu (Henderson, 1977). U ovocných stromů se polyploidie indukuje s cílem zvýšení odolnosti vůči abiotickým stresům. Příkladem jsou jabloně (*Malus prunfolia*), kde byli aplikací kolchicinu indukovaní triploidi výrazněji tolerantnější vůči solnému stresu (Jin et al., 2022). Chemické ošetření je také typické pro šlechtění hospodářských plodin, jako je cukrová řepa (*Beta vulgaris*; DeLaat, Gohde a Vogelzakg, 1987), kukuřice setá (*Zea mays*; Wan *et al.*, 1991; Arshad *et al.*, 2023) nebo obiloviny, včetně pšenice seté (*Triticum* aestivum; Broughton *et al.*, 2020). Častý cíl indukce představuje nejen zvýšený výnos, ale také zisk dvojitých haploidů. Tato technika umožňuje produkci zcela homozygotních inbredních linií již během první generace a usnadňuje tak proces šlechtění (Broughton et al., 2020).

V okrasném zahradnictví se polyploidizace uplatňuje u širokého spektra bylin, keřů i stromů. Často polyploidizovaným organismem jsou růže, u kterých proběhla úspěšná indukce pomocí různých chemických činidel, od kolchicinu, přes dinitroaniliny. Cílem syntetické polyploidizace je zde nejen zisk větších květů a silnějších stonků, ale také překonání sterility u hybridů (Allum et al., 2007; Kermani et al., 2003; Zlesak et al., 2005). Příkladem dalších úspěšně polyploidizovaných okrasných bylin je plamenka šídlovitá (*Phlox subulata*; Zhang *et al.*, 2007), hledík větší (*Antirrhinum maju*; Hlaing *et al.*, 2021), či alokázie (*Alocasia* spp.; Thao *et al.*, 2003). I u těchto zástupců byla polyploidie indukována především kvůli vylepšení okrasných vlastností vlivem gigas efektu. Z keřů lze zmínit komule (*Buddleja* spp.; Dunn a Lindstrom, 2007), u kterých se aplikací oryzalinu podařilo obnovit plodnost sterilních kříženců, nebo kdoulec japonský (*Chaenomeles japonica*; Stanys *et al.*, 2006), či zástupce rodu *Rhododendron* (Väinölä, 2000). Z řad lesnicky a okrasně významných stromů s úspěšnou fyzikální indukcí teplotními šoky je topol Simonův (*Populus simonii*; Guo *et al.*, 2017). Příkladem chemicky indukované polyploidní dřeviny je platan javorolistý (*Platanus acerifolia*; Liu, Li a Bao, 2007). Hlavním cílem této experimentální studie byla tvorba sterilních stromů pro minimalizaci znečištění městských ulic pylem a plody. U farmakologicky významné máty klasnaté (*Mentha spicata*) se umělou polyploidizací oryzalinem podařilo zvýšit aktivitu biosyntetických drah a produkci sekundárních metabolitů - esenciálních olejů, karvonu a linolenu (Madani *et al.*, 2021; Bharati, Fernández, *et al.*, 2023). Podobných efektů bylo dosaženo i u meduňky lékařské (*Melisaa officinalis*; Bharati, Gupta, *et al.*, 2023). U durmanu obecného (*Datura stramonium*) se indukcí kolchicinem zvýšila produkce tropanových alkaloidů (skopolaminu a hyoscyaminu; (Berkov & Philipov, 2002). Umělá tetraploidizace pelyňku ročního (*Artemisia annua*) vedla dále ke zvětšení produkce antimalarika artemisinu, a to o 39 % až 56 % (Lin et al., 2011).



Obr. 6: ***Porovnání morfologie plamenky šídlovité*** *– nalevo diploid, napravo tetraploid (Zhang et al., 2007)*

5.3 Syntetičtí polyploidi mikrořas

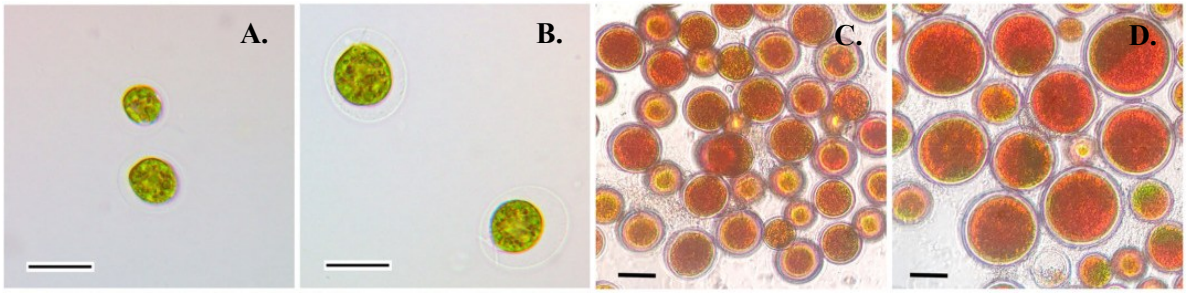
Přestože u vyšších rostlin je umělá indukce polyploidů běžně používanou metodou, u mikroorganismů je tato metoda využívána jen zcela výjimečně. U mikroskopických řas byla syntetická produkce polyploidů úspěšně použita dokonce jen v několika málo případech (Le-Feuvre et al., 2021).

Polyploidie byla zřejmě indukována u jednobuněčné zelené řasy *Chlamydomonas eugametos* a *C. reinhartii* (Wetherell a Krauss (1956)). Po aplikaci kolchicinu buňky zvětšily až 10krát svůj objem a kmen zároveň vykazoval zvýšenou produkci biomasy. V novější studii na *C. reinhartii* byla polyploidie indukována aplikací méně toxického demekolcinu. I zde buňky zvětšily svůj objem (1,7krát), dále pak zvýšily produkci lipidů i odolnost vůči chladu, nedostatku dusíku a oxidativnímu stresu (Kwak et al., 2017).

Pokus s kolchicinovým ošetřením proběhl i u jednobuněčné zelené řasy *Dunaliella salina*. Expozice (0,1% a 0,5% roztok, po dobu 36 hodin) vedla k indukci polyploidie u 58 % až 74 % populace. Přestože buňky výrazně zvětšily svůj objem, ošetření snížilo rychlost růstu a celkovou životaschopnost (Nezhad & Mansouri, 2019). Tento inhibiční efekt se však podařilo snížit přidáním rostlinných fytohormonů giberelinu a auxinu. Zatímco giberelin stimuloval tvorbu sacharidů, auxin podpořil akumulaci proteinů a obnovu rychlého růstu. Díky tomu byla obnovena původní rychlost buněčného dělení a u těchto polyploidních kmenů se navíc zvýšila produkce chlorofylu, karotenoidů, glycerolu i dalších zásobních látek (Mansouri & Soltani Nezhad, 2021).

U průmyslově významné zelené mikrořasy *Haematococcus lacustris* (dříve *H. pluvialis*) se polyploidii podařilo indukovat dvěma zcela rozdílnými postupy. První metodou byla fúze protoplastů. Pohyblivá stádia řasy, tzv. zoospory, byla zbavena buněčné stěny aplikací proteinázy K a následně ponechána splynutí. Tento proces vedl k tvorbě buněk s dvojnásobným objemem a trojnásobným výtěžkem karotenoidu astaxanthinu (Tjahjono et al., 1994). V druhém případě byla řasa tradičněji ošetřena kolchicinem. To vedlo k indukci stabilního polyploidiního kmene, který měl následně výrazně větší buňky i zvýšenou produktivitu. V laboratorních podmínkách byla produkce astaxanthinu o 33 % větší. Po umístění do venkovních nádrží produkoval tento polyploidní kmen dokonce o 60 % více karotenoidu (Le-Feuvre et al., 2021).

K dalším zástupcům mikrořas, které byly ošetřeny antimitotickými látkami, patří zelená řasa *Chlorella sp.*, u které aplikace kolchicinu indukovala buňky s vyšším počtem jader a mohutnějším endoplazmatickým retikulem (Wanka, 1968). Kolchicin byl také aplikován u zelené řasy *Sphaeroplea annulina*, avšak pouze pro účely studia průběhu mitózy (Sarma, 1957).



Obr. 7: ***Světelná mikroskopie komerčně běžně užívaného kmenu 024 a polyploidního kmenu P3*** **Haematococcus lacustris** *A) zoospory kmene 024 B) polyploidní zoospory kmenu P3 C) aplanospory kmene 024 D) polyploidní aplanospory kmene P3 (Le-Feuvre et al., 2021), upraveno autorem práce*

5.3.1 Biotechnologický potenciál

Mikrořasy se díky své produkci mnoha využitelných látek hojně využívají v potravinářském a kosmetickém průmyslu nebo při výrobě krmiv a biopaliv (Hyka et al., 2013). Polyploidizace a s ní spojené vlastnosti představují nástroj, který by mohl biotechnologický potenciál mikrořas ještě umocnit. Díky gigas efektu mohou polyploidiní kmeny vykazovat mnohonásobně vyšší produktivitu cenných látek a vyšší výnosy biomasy. Důležitým faktorem je také přítomnost zvýšené tolerance vůči abiotickým (chlad, oxidační stres, limitace živin) i biotickým stresorům (kontaminanty, parazité), která byla již u polyploidních kmenů ukázána (například Kwak *et al.*, 2017). Vyšší odolnost je navíc klíčová pro často využívanou venkovní masovou kultivaci. Výhodou indukované polyploidie je také udržení statusu GRAS (Generally Recognized As Safe), díky čemuž uměle vytvoření polyploidi nespadají pod přísné legislativní kontroly GMO (Genetically Modified Organism) a jejich využití v potravinářství či farmakologii je tak mnohem snazší (Kwak et al., 2017; Le-Feuvre et al., 2021). Avšak i zde může být chemická indukce spojena s určitými limitacemi, jako je vznik nestabilních mixoploidních jedinců, zpomalení růstu a buněčného dělení či vysoká úmrtnost, zejména při aplikaci kolchicinu. Negativní vliv kolchicinu by bylo možné zmírnit nahrazením jinými antimitotickými látkami, například dinitroaniliny. Fyziologická selektivita dinitroanilinů vyplývá z molekulární specifity α-tubulinové podjednotky. Tuto strukturní podobnost sdílí s vyššími rostlinami také zástupci mnoha skupin mikroskopických organismů, včetně řady skupin mikrořas (Ma et al. 2010; Dostál a Libusová 2014). Vzhledem ke své příbuznosti jsou tubuliny zelených chlorofytních řas strukturně nejbližší tubulinům vyšších rostlin. Strukturně homologní tubulin však sdílejí i fylogeneticky vzdálenější vývojové skupiny Alveolata nebo některé Stramenopilní skupiny (například rozsivky a zlativka). Proto lze předpokládat, že právě dinitroaniliny (například oryzalin) by mohly být vhodnými chemickými činidly pro indukci polyploidie u mikrořas (Keeling a Doolittle 1996; Dostál a Libusová 2014).

6 ZÁVĚR

Polyploidie představuje zásadní genetickou změnu, která v organismech vyvolává významné a často žádané fenotypové a fyziologické změny, pro které je často i cíleně uměle indukována. Typickým

projevem je tzv. gigas efekt, který se vyznačuje zvětšením buněk i orgánů, a časté stimulace produkce. Žádanou vlastností syntetických polyploidů je také zvýšená tolerance vůči různým typům stresorů. Výhodou může být i sterilita některých polyploidů, díky které neznečišťují polyploidní okrasné stromy ulice spadlými plody a květy, či hospodářský chované polyploidní ryby šetří energii pro somatický růst.

V zemědělství, šlechtitelství, nebo akvakultuře je indukce polyploidie v současné době běžně využívána. Moderní metody chemické indukce jsou efektivním a často bezpečným prostředkem pro umělé navození polyploidního stavu. Tradičně nejpoužívanější antimitotickou látkou je alkaloid kolchicin. Ten se vyznačuje silnou afinitou k živočišným tubulinům a s tím i spojenou vysokou toxicitou nejen pro živočichy, ale i pro člověka. V současnosti patří k činidlům s největším potenciálem dinitroaniliny, zejména oryzalin a trifluralin. Tyto látky svými účinky dosahují často efektivnějších výsledků, a zároveň představují menší riziko pro manipulátora i samotné exponované rostlinky.

Velký potenciál představuje rozšíření těchto metod pro syntetickou produkci polyploidů mikroorganismů. V tomto ohledu jsou velice významnou skupinu s širokým komerčním i biotechnologickým potenciálem mikrořasy. Protože experimentálně indukované polyploidní kmeny vykazovaly výrazně vyšší produkci či odolnost, jejich aplikace v biotechnologickém průmyslu by tak mohla významně zlepšit efektivitu jejich využití. Omezení v tomto ohledu však představuje nedostatek publikovaných protokolů pro mikrořasy. V navazující diplomové práci se proto zaměřím na vývoj nových protokolů využitelných pro biotechnologicky zajímavé druhy mikrořas využívajících oryzalin jako indukční činidlo. Při úspěšně indukované polyploidii budu následně srovnávat vlastnosti nepolyploidních a polyploidních kmenů, které by, v případě zlepšení vlastností, mohly být dále využity v experimentech a biotechnologiích.

Skupina organismů	Navrhovaná metoda indukce	Benefity	Limitace a rizika	Mechnaismus účinku	Zdroj
Savci (*Mammalia*)	cytochalasin B	poměrně vysoká účinost *in vitro*	vysoká toxicita, snížená životaschopnost	blokace cytokineze narušením mikrotubulů	[1], [2], [15]
Ryby (*Teleostei*)	hydrostatický tlak	efektivní a uniformní působení na vřeténko	velice citlivé na přesnost načasování, nákladné, aneuploidie	depolymerizae mikrotubulů, potlačení uvolnění pólového tělíska nebo blokace karyo- a cytokineze	[3] - [5]
Obojživelníci (*Amphibia*)	teplotní šoky	méně náročné (vybavení, provedení), bezpečné pro člověka	hůře kontrolovatelné, časté vedlejší účinky (deformace, zpomalený růst)	potlačení uvolnění pólového tělíska A) denaturací mikrotubulů B) inhibicí anafáze II	[6], [7]
Mlži (Bivalvia)	teplotní šoky (+kofein)	vysoká efektivita, méně toxické (než kolchicin)	druhově specifická úspěšnost	potlačení uvolnění pólového tělíska A) denaturací mikrotubulů B) inhibicí anafáze II	[8]
Hmyz (Insecta)	tepelné šoky (centrifugace)	jednoduchost, dostupné, velké množství embryí	hůře kontrolovatelné, časté vedlejší účinky, vysoká mortalita	indukce partenogeneze se zadržením původní diploidní sady	[6]
	kolchicin	specificky cílené na mikrotubuly, ošetření před oplozením	nestabilita, vysoká mortalita, častá zástava vývoje, mixoploidie	inhibice mikrotubulů vazbou, kolabs dělicího vřeténka	[6]
Vyšší rostliny (*Embryophyta*)	oryzalin, trifluralin	vysoká specifita k rostlinnému tubulinu, nižší toxicita než kolchicin, bezpečná manipulace	nutnost optimalizace, pomalejší nástup účinku	depolymerizace mikrotubulů vazbou, kolabs dělicího vřeténka	[10] - [13]
Chlorophyta	demekolchicin	nižší toxicita (než kolchicin), lepší kontrolovatelnost	nižší účinnost než kolchicin, méně spolehlivý, nutná optimalizace	narušení mikrotubů během mitózy vazbou	[14]
	oryzalin*	vyšší affinita, nižší koncentrace, bezpečná manipulace	nedostatek standardizovaných protokolů	depolymerizace mikrotubulů vazbou, kolabs dělicího vřeténka	x
Stramenopila	oryzalin*	vyšší affinita, nižší koncentrace, bezpečná manipulace	nedostatek standardizovaných protokolů	depolymerizace mikrotubulů vazbou, kolabs dělicího vřeténka	x
Alveolata	oryzalin*	vyšší affinita, nižší koncentrace, bezpečná manipulace	nedostatek standardizovaných protokolů, komplexní životní cykly **	depolymerizace mikrotubulů vazbou, kolabs dělicího vřeténka	x

Tabulka 1: **Navrhovaná nejvhodnější činidla pro indukci polyploidie u vybraných skupin organismů**

* předpoklad na základě podobnosti s rostlinným tubulinem

** možná omezená účinnost v důsledku uzavřené mitózy (např. obrněnky)

Souhrnná tabulka (*Tabulka 1*) byla sestavena na základě údajů dostupných v odborné literatuře. Její interpretace je limitována omezeným množstvím publikovaných experimentálních studií a dostupných protokolů, zejména u některých skupin organismů, u kterých je polyploidie méně prozkoumaná nebo metodicky obtížná. Uvedená indukční činidla jsou navrhována na základě dostupných dat, jejich účinnost se však nemusí vztahovat na všechny zástupce dané skupiny.

Zdroje k příloze: [1] Snow 1973 [2] Hoehn et al. 1973 [3] Lou a Purdom 1984b [4] Chourrout 1984 [5] Aldridge et al. 1990 [6] Fankhauser 1945 [7] Gillespie a Armstrong 1979 [8] Durand et al. 1990 [9] Bharati et al. 2023a [10] Allum et al. 2007 [11] Dunn a Lindstrom 2007 [12] Väinölä 2000 [13]Zlesak et al. 2005; [14] Kwak et al. 2017 [15] Niemierko a Komar 1976

LITERATURA A ZDROJE:

Aldridge, F. J., Marston, R. Q., & Shireman, J. V. (1990). Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis,* verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture*, *87, 121–131.*

Allen, S. K., & Stanley, J. G. (1979). Polyploid Mosaics Induced by Cytochalasin B in Landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar. Transactions of the American Fisheries Society*, *108*(5), 462–466.

Allum, J., Bringloe, D. H., & Roberts, A. (2007). Chromosome doubling in a *Rosa rugosa Thunb*. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant cell reports*, *26*, 1977–1984.

Aronson, J., & Inoué, S. (1970). Reversal by light of the action of N-methyl N-desacetyl colchicine on mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 45(2), 470–477.

Arshad, S., Wei, M., Ali, Q., Mustafa, G., Ma, Z., & Yan, Y. (2023). Paclitaxel and Caffeine–Taurine, New Colchicine Alternatives for Chromosomes Doubling in Maize Haploid Breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), 14659.

Ascough, G. D., Staden, J. van, & Erwin, J. E. (2008). Effectiveness of Colchicine and Oryzalin at Inducing Polyploidy in *Watsonia lepida* N.E. Brown. *HortScience*, *43*(7), 2248–2251.

Bae, S.-J., Islam, M. M., Kim, H.-Y., & Lim, K.-B. (2020). Induction of Tetraploidy in Watermelon with Oryzalin Treatments. *Horticultural Science and Technology*, *38*(3), 385–393.

Bajer, A. S., & Molè-Bajer, J. (1986). Reorganization of microtubules in endosperm cells and cell fragments of the higher plant *Haemanthus* in vivo. *The Journal of cell biology*, 102(1), *263–281*

Banerjee, M., Roy, D., Bhattacharyya, B., & Basu, G. (2007). Differential colchicine-binding across eukaryotic families: The role of highly conserved Pro268β and Ala248β residues in animal tubulin. *FEBS Letters*, *581*(26), 5019–5023.

Barow, M., & Meister, A. (2003). Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell and Environment*, *26*, 571–584.

Beatty, R. A., & Fischberg, M. (1952). Heteroploidy in mammals. *Journal of Genetics*. *50(3),* 471–479.

Benfey, T. J., & Sutterlin, A. M. (1984). Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, *36*(4), 359–367.

Berger, C. A., & Witkus, E. R. (1943). A Cytological Study of C-Mitosis in the Polysomatic Plant *Spinacia oleracea*, with Comparative Observations on *Allium cepa*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *70*(5), 457–466.

Berkov, S., & Philipov, S. (2002). Alkaloid Production in Diploid and Autotetraploid Plants of *Datura stramonium*. *Pharmaceutical Biology, 40*, 617–621.

Bharati, R., Fernández, E., Gupta, A., Novy, P., Okao, M., Severová, L., Svoboda, R., & Rédl, K. (2023). Oryzalin induces polyploids with superior morphology and increased levels of essential oil production in *Mentha spicata L*. *Industrial Crops and Products*, *198*, 116683.

Bharati, R., Gupta, A., Novy, P., Severová, L., Šrédl, K., Ziarovska, J., & Fernández, E. (2023). Synthetic polyploid induction influences morphological, physiological, and photosynthetic characteristics in *Melissa officinalis L*. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1332428.

Broughton, S., Castello, M., Liu, L., Killen, J., A. Hepworth & R. OĹeary. (2020). The Effect of Caffeine and Trifluralin on Chromosome Doubling in Wheat Anther Culture. *Plants*. *9(1)*, 105

Carter, S. B. (1967). Effects of Cytochalasins on Mammalian Cells. *Nature*. 261–264.

Cassani, J. R., & Caton, W. E. (1986). Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture*. *55*, 43–50.

Castro, M., Castro, S., & Loureiro, J. (2018). Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. *Web Ecology*, *18*(2), 129–141.

Cuellar, O., & Uyeno, T. (1972). Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetic and Genome Research*. *11*, *508–515*.

Dasgupta, S. (1962). Induction of triploidy by hydrostatic pressure in the leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology*. *151(2)*, 105–121.

De Storme, N., Copenhaver, G. P., & Geelen, D. (2012). Production of Diploid Male Gametes in *Arabidopsis* by Cold-Induced Destabilization of Postmeiotic Radial Microtubule Arrays. *Plant Physiology*. *160*, 1808–1826.

DeLaat, A. M. M., Gohde, W., & Vogelzakg, M. J. D. C. (1987). Determination of Ploidy of Single Plants and Plant Populations by Flow Cytometry. *Plant Breeding*. *99*, 303–307.

Dempsey, E., Prudêncio, M., Fennell, B. J., Gomes-Santos, C. S., & Et., A. (2013). Antimitotic herbicides bind to an unidentified site on malarial parasite tubulin and block development of liver-stage *Plasmodium* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. *188(2),* 116–127.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Et., A. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104,* 359–373.

Dostál, V., & Libusová, L. (2014). Microtubule drugs: Action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma*, *251*(5), 991–1005.

Dunn, B. L., & Lindstrom, J. T. (2007). Oryzalin-induced Chromosome Doubling in *Buddleja* to Facilitate Interspecific Hybridization. *HortScience*, *42*(6), 1326–1328.

Durand, P., Wada, K. T., & Komaru, A. (1990). Triploidy induction by caffeine-heat shock treatments in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Nappon Suisan Gakkaishi*, *56(9),* 1423–1425.

Fankhauser, G. (1945). The Effects of Changes in Chromosome Number on Amphibian Development. *The Quarterly Review of Biology*. *20*, 20–78.

Frandsen, N. O. (1968). Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel. *Theoretical and Applied Genetics*. *38*, 153–167.

Galbraith, D. W., Harkins, K. R., & Knapp, S. (1991). Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. *96*, 985–989.

Gaut, B. S., & Doebley, J. F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize, *Proceedings of the National Academy of Science, 94(13),* 985–993.

Gervai, J., Páter, S., Nagy, A., Horváth, L., & Et., A. (1980). Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*. *17*, 667–671.

Gillespie, L. L., & Armstrong, J. B. (1979). Induction of triploid and gynogenetic diploid axolotls (*Ambystoma mexicanum*) by hydrostatic pressure. *Journal of Experimental Zoology*. *210*, 117–122.

Giménez-Martin, G., López-Sáez, J. F., Moreno, P., & González-Fernández, A. (1968). On the triggering of mitosis and the division cycle of polynucleate cells. *Chromosoma*. *25*, 282–296.

Gross, F. (1932). Untersuchungen über die Polyploidie und die Variabilität bei *Artemia salina*. *Die Naturwissenschaften*. *51,* 962–967.

Guo, L., Xu, W., Zhang, Y., Zhang, J., & Wei, Z. (2017). Inducing triploids and tetraploids with high temperatures in *Populus sect. Tacamahaca*. *Plant Cell Reports*, *36*(2), 313–326.

Hansen, F. L., Andersen, S. B., Due, I. K., & Olesen, A. (1988). Nitrous oxide as a possible alternative agent for chromosome doubling of wheat haploids. *Plant Science*. *54,* 219–222.

Hase, Y., Trung, K. H., Matsunaga, T., & Tanaka, A. (2006). A mutation in the uvi4 gene promotes progression of endo-reduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *The Plant Journal*, *46*(2), 317–326.

Henderson, W. (1977). Effect of Cultivar, Polyploidy and "Reciprocal" Hybridization on Characters Important in Breeding Triploid Seedless Watermelon Hybrids1. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *102*, 293–297.

Hidalgo, A., González-Reyes, J., Navas, P., & García-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by propham and chlorpropham. *Cytobios*, *57*, 7–14.

Hlaing, T. S., Kondo, H., Deguchi, A., & Miyoshi, K. (2021). Induction of adventitious shoots and tetraploids in *Antirrhinum majus* L. by treatment of antimitotic agents in vitro without plant growth regulators. *Plant Biotechnology*, *38*(1), 145–152.

Ho, I., Wan, Y., Widholm, J. M., & Rayburn, A. L. (1990). The Use of Stomatal Chloroplast Number for Rapid Determination of Ploidy Level in Maize. *Plant Breeding*. *105,* 203–210.

Hoehn, H., Sprague, C. A., & Martin, G. M. (1973). Effects of cytochalasin B on cultivated human diploid fibroblasts and its use for the isolation of tetraploid clones. *Experimental Cell Research*. *76*, 170–174.

Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., & Et., A. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*. *31*, 2–16.

Chase, R., & Tolloczko, B. (1987). Evidence for differential DNA endoreplication during the development of a molluscan brain. *Journal of Neurobiology*. *18(5),* 395–406.

Chen, L., Wang, Y., & Zhao, M. (2006). In vitro Induction and Characterization of Tetraploid *Lychnis senno Siebold et Zucc*. *HortScience*, *41*(3), 759–761.

Chourrout, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*. *36*, 111–126.

Inoué, S., & Sato, H. (1967). Cell Motility by Labile Association of Molecules. *The Journal of General Physiology*. *50(6),* 259–292.

Jin, Y., Zhao, Y., Ai, S., Chen, X., Liu, X., Wang, H., Han, Y., Ma, F., & Li, C. (2022). Induction of polyploid *Malus prunifolia* and analysis of its salt tolerance. *Tree Physiology*, *42,* 2100–2215.

Jung, H. S., Kim, J., Lee, S. H., Choi, J. H., & Kang, J.-H. (2026). First report of tetraploid induction by cold-shock treatment in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Reports*, *46*, 103397.

Kato, A., & Geiger, H. H. (2002). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding*. *121,* 370–377.

Kawaguchi, E. (1938). Der Einfluß der Eierbehandlung mit Zentrifugierung auf die Vererbung bei dem Seidenspinner. III. *Cytologica*, *9*, 88–96.

Keeling, P. J., & Doolittle, W. F. (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Molecular Biology and Evolution*. *13(10),* 1297–1305.

Kermani, M. J., Sarasan, V., Roberts, A. V., Yokoya, K., Wentworth, J., & Sieber, V. K. (2003). Oryzalin-induced chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(7), 1195–1200.

Kwak, M., Park, W.-K., Shin, S.-E., Koh, H.-G., & Et., A. (2017). Improvement of biomass and lipid yield under stress conditions by using diploid strains of *Chlamydomonas reinhardtii. Algal Research*. *26*, 180–189.

Le-Feuvre R., Morgana-Suazo P., González-Durán J., San Martin S., Valdevenito A., Henríquez V., Rojas V., Agurto A., Agurto-Munoz C. (2021). Chemical induction of polyploidy increases astaxanthin accumulation capacity in the microalgae *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chantr.) Rostaf. *Algal Research*, *59*, 102465.

Lemoine, H. L., & Smith, L. T. (1980). Polyploidy Induced in Brook Trout by Cold Shock. *Transactions of the American Fisheries Society*. *109(6),* 626–631.

Levan, A. (1938). The Effect of Colchicine on Root Mitoses in *Allium*. *Hereditas*, *24*(4), 471–486.

Levan, A. (1940). The Effect of Acenaphthene and Colchicine on Mitosis of Allium and Colchicum. *Hereditas*, *26*(3–4), 262–276.

Levin, D. A., & Wilson, A. C. (1976). Rates of evolution in seed plants: Net increase in diversity of chromosome numbers and species numbers through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(6), 2086–2090.

Lin, X., Zhou, Y., Zhang, J., Lu, X., & Et., A. (2011). Enhancement of artemisinin content in tetraploid *Artemisia annua*plants by modulating the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. *58,* 50–57.

Liu, G., Li, Z., & Bao, M. (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*, *157*(1), 145–154.

Liu, S., Liu, Y., Zhou, G., Zhang, X., & Et., A. (2001). The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture*. *192,* 171–186.

Lou, Y. D., & Purdom, C. E. (1984). Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*. *25,* 345–351.

Luckett, D. J. (1989). Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica*. *42*, 177–182.

Ma, C., Tran, J., Gu, F., Ochoa, R., & Et., A. (2010). Dinitroaniline Activity in *Toxoplasma gondii* Expressing Wild-Type or Mutant α-Tubulin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. *54(4),* 1453–1460.

Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., & Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, *11*(6), 899

Mansouri, H., & Soltani Nezhad, F. (2021). Changes in growth and biochemical parameters in *Dunaliella salina* (*Dunaliellaceae*) in response to auxin and gibberellin under colchicine-induced polyploidy. *Journal of Phycology*, *57*(4), 1284–1294.

Masterson. (1994). Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *264*, 421–424.

Melaragno, J. E., Mehrotra, B., & Coleman, A. W. (1993). Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. *5,* 1661–1668.

Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Molé-Bajer, J., Bajer, A. S., & Et., A. (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*. *172,* 252–264.

Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Tocchi, L. P., & Fosket, D. E. (1984). Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(5), 1440–1444.

Morejohn, L. C., & Fosket, D. E. (1984). Inhibition of Plant Microtubule Polymerization in vitro by the Phosphoric Amide Herbicide Amiprophos-Methyl. *Science*. *24,* 874–876.

Morgan, E. J., Čertner, M., Lučanová, M., Deniz, U., & Et., A. (2021). Disentangling the components of triploid block and its fitness consequences in natural diploid–tetraploid contact zones of *Arabidopsis arenosa*. *New Phytologist*. *232(3)*, 1449–1462.

Morgan, E. R., Hofmann, B. L., & Grant, J. E. (2003). Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *Japonica* 'Royal Blue' plants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. *31(1),* 65–68.

Muller, H. J. (1925). Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants. *Biological Journal of the Linnean Society, 59(663)*, 346–353.

Münzbergová, Z. (2017). Colchicine application significantly affects plant performance in the second generation of synthetic polyploids and its effects vary between populations. *Annals of Botany*. *120(2), 329–339.*

Myers, J. M., Hershberger, W. K., & Iwamoto, R. N. (1986). The Induction of Tetraploidy in Salmonids. *Journal of the World Aquaculture Society*. *17(1–4)*, 1–7.

Nezhad, F. S., & Mansouri, H. (2019). Induction of Polyploidy by Colchicine on the Green Algae *Dunaliella salina*. *Russian Journal of Marine Biology*. *45(2),* 106–112.

Niemierko, A., & Komar, A. (1976). Cytochalasin B-induced triploidy in mouse oocytes fertilized *in vitro*. *Reproduction*. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0480279

Ntuli, N., & Zobolo, A. M. (2010). Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and Lagenaria *sphaerica* plants. *African Journal of Biotechnology*, *7(20),* 3548–3658.

Ownbey, M. (1950). Natural Hybridization and Amphiploidy in the Genus *Tragopogon*. *American Journal of Botany*, *37*(7), 487–499.

Pennock, L. A. (1965). Triploidy in Parthenogenetic Species of the Teiid Lizard, Genus *Cnemidophorus*. *Science, 149*, 539–540.

Ptacek, M. B., Gerhardt, H. C., & Sage, R. D. (1994). Speciation by Polyploidy in Treefrogs: Multiple Origins of the Tetraploid, *Hyla Versicolor*. *Evolution*, *48*(3), 898–908.

Purdom, C. E. (1972). Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (Platichthys flesus). *Heredity*, *29 11–24.*

Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). PATHWAYS, MECHANISMS, AND RATES OF POLYPLOID FORMATION IN FLOWERING PLANTS. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *29*(Volume 29, 1998), 467–501.

Refstie, T., Vassvik, V., & Gjedrem, T. (1977). Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B. *Aquaculture, 10*, 65–74.

Sakhanokho, H., Rajasekaran, K., Kelley, R., & Faridi, N. (2009). Induced Polyploidy in Diploid Ornamental Ginger (Hedychium muluense R. M. Smith) Using Colchicine and Oryzalin. *HortScience*, *44*, 1809–1814.

Sari, N., Abak, K., & Pitrat, M. (1999). Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (*Thunb*.) Matsum. and Nakai. *Scientia Horticulturae 82,* 265–277.

Sarma, Y. S. R. K. (1957). Effects of Colchicine on the Green Alga *Sphaeroplea annulina* (Roth) Ag. *Cytologia, 22,* 113–117.

Snow, M. H. L. (1973). Tetraploid Mouse Embryos produced by Cytochalasin B during Cleavage. *Nature*, *244,* 513–515.

Solar, I. I., Donaldson, E. M., & Hunter, G. A. (1984). Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture*, *42,* 57–67.

Song et al. (1995, září). Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution*, Proceedings of the National Academy of Science, 92*, 7719–7723.

Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., & Duchovskis, P. (2006). In vitro induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *84,* 263–268.

Stebbins, G. L. (1950). *Variation and evolution in plants*. New York, Columbia University Press.

Swarup, H. (1959a). Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus (L). Journal of Genetics*, *56*(2), 129–142.

Swarup, H. (1959b). Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus (L.). Journal of Genetics, 56*(2), 143–155.

Šedivá, J., Mrázková, M., Zahumenická, P., Cusimamani, E. F., Zahradník D. (2019). Identification of Phytophthora tolerance in the *Anemone sylvestris* tetraploid. *Scientia Horticulturae*, 256, *108579*

Taylor, N. L., Anderson, M. K., Quesenberry, K. H., & Watson, L. (1976). Doubling the Chromosome Number of *Trifolium* Species Using Nitrous Oxide. *Crop Science*, *16*, 516–518.

Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., & Okubo H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *72,* 19–25.

Thomas, J., Chen, Q., & Howes, N. (1997). Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome*, *40,* 552–558.

Tjahjono, A. E., Kakizono, T., Hayama, Y., Nishio, N., & Nagai N. (1994). Isolation of resistant mutants against carotenoid biosynthesis inhibitors for a green alga *Haematococcus pluvialis*, and their hybrid formation by protoplast fusion for breeding of higher astaxanthin producers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. *77(4),* 352–357.

Väinölä, A. (2000). Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, *112*, 239–244.

Valenti, R. J. (1975). Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *Journal of Fish Biology*, *7,* 519–528.

Van Dilla, M. A., Truiullo, T. T., Mullaney, P. F., & Coultex, J. R. (1969). Cell Microfluorometry: A Method for Rapid Fluorescence Measurement. *Science*, *163,* 1213–1214.

Vaughan, M. A., & Vaughn, K. C. (1987). Pronamide disrupts mitosis in a unique manner. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *28*(2), 182–193.

Wan, Y., Duncan, D. R., Rayburn, A. L., Petolino, J. F., & Widholm J. M.(1991). The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*. *81,* 205–211.

Wanka, F. (1968). Ultrastructural changes during normal and colchicine-inhibited cell division of *Chlorella*. *Protoplasma 66,* 105–130.

Wetherell, D. F., & Krauss, R. W. (1956). Colchicine-Induced Polyploidy in *Chlamydomonas*. *Science*, *124,* 25–26.

Winkler, H. (1916). Über die experimentelle Erzeugung yon Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, *17*(3), 270–272.

Wood, T., Takebayashi, N., Barker, M., Mayrose, I., Greenspoon, P., & Rieseberg, L. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106(33)*, 13875–13879.

Yamasaki, S., Shimada, E., Kuwano, T., Kawano, T., & Noguchi, N. (2010). Continuous UV-B Irradiation Induces Endoreduplication and Peroxidase Activity in Epidermal Cells Surrounding Trichomes on Cucumber Cotyledons. *Journal of Radiation Research*, *51*(2), 187–196.

Yang, H., & Guo, X. (2006). Polyploid induction by heat shock-induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis Say. Aquaculture*, *252¸171–182.*

Yasuhara, H. (2005). Caffeine Inhibits Callose Deposition in the Cell Plate and the Depolymerization of Microtubules in the Central Region of the Phragmoplast. *Plant and Cell Physiology*, *46(7),* 1083–1092.

Younis, A., Hwang, Y.-J., & Lim, K.-B. (2013). Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant Cell Rep. 33(2),* 215–223.

Zedek, F., Plačková, K., Veselý, P., Šmerda, J., Šmarda, P., Horová, L., & Bureš, P. (2020). Endopolyploidy is a common response to UV-B stress in natural plant populations, but its magnitude may be affected by chromosome type. *Annals of Botany*, *126*(5), 883–889.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M., & Liu, X. (2007). In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata L*. *Euphytica*, *159,* 59–65.

Zhou, Q., Cheng, X., Kong, B., Zhao, Y., Li, Z., Sang, Y., Wu, J., & Zhang, P. (2022). Heat shock-induced failure of meiosis I to meiosis II transition leads to 2n pollen formation in a woody plant. *Plant Physiology*, *189*(4), 2110–2127.

Zhou, X. Y., Li, M. Y., Abbas, K., Gao, Z. X., & Et., A. (2008). Comparison of ploidy level screening methods in Chinese dojo loach *(Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Applied Ichthyology*, *24,* 664–669.

Zlesak, D. C., Thill, C. A., & Anderson, N. O. (2005). Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (*Sims)* Voss seedlings. *Euphytica*, 141, 281–290.