UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie rostlin

Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): Ovlivnění výtěžků a kvality embryí změnami v dostupnosti sacharidů během zrání na tekutých médiích

Nikola Drážná

diplomová práce

Praha 2006

Školitel: RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Konzultant: Mgr. Martin Kubeš

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma

„Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): Ovlivnění výtěžků a kvality embryí změnami v dostupnosti sacharidů během zrání na tekutých médiích“

vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Heleny Lipavské, PhD. a Mgr. Martina Kubeše s využitím citované literatury, na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2004 až 2006. Souhlasím s případným zapůjčením práce pro studijní a vědecké účely.

Nikola Drážná

Na tomto místě bych ráda poděkovala

- RNDr. Heleně Lipavské, PhD. za odborné vedení práce, konzultace a cenné připomínky k rukopisu. Rovněž děkuji za přátelský, obětavý a povzbudivý přístup.
- Mgr. Martinu Kubešovi za konzultace, podnětné připomínky a nápady.
- Mgr. Lukáši Hudcovi za trpělivé zasvěcení do experimentálních a analytických metod.
- Olze Činglové za mnohé rady při experimentální práci a přátelský přístup.
- Všem členům naší laboratoře, Petře Vojvodové, Petře Maškové, Lucii Uchytilové, Lence Šúťákové, Kláře Čihákové, Ondřeji Skalovi, Janu Ponertovi za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a za ochotu vždy poradit a pomoci.
- Všem členům katedry fyziologie rostlin PřF UK, kteří vytvářejí příjemné prostředí pro studium a vědeckou práci.

Děkuji svému příteli Jirkovi za láskyplný přístup a toleranci během studia a psaní této diplomové práce.
Děkuji svým rodičům za trpělivost a podporu během studia.

Diplomová práce byla financována projektem COST OC 843.40 (2000).

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
BAP	N6-benzylaminopurin
ESM	embryonálně-suspenzorová hmota (embryonal suspensor mass)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LCO	lipochitooligosacharidy
LEA	hojné v pozdních fázích embryogeneze (late embryogenesis abundance)
MES	kyselina 2-N-morfolinoetansulfonová
MK	mastné kyseliny
PEG	polyethylenglykol
RFO	oligosacharidy rafinózové řady
SE	somatická embrya
TAG	triacylglyceroly
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
3-O-mGlc	3-O-metyl glukóza
6-dGlc	6-deoxy-D-glukóza

Abstrakt

Somatic embryogenesis of Norway spruce (*Picea abies*) presents both promising means of propagation and valuable model system for investigating the structural, physiological and molecular events occurring during embryo development. Somatic embryogenesis is a process in which a bipolar structure, somatic embryo develops from non-zygotic cell through series of developmental steps similar to zygotic embryogenesis. The efficiency of every phase depends on the previous ones. Important changes in structure and physiology of somatic embryo happen in maturation phase. Embryo accumulates storage compounds (saccharides, lipids and proteins), that are necessary for post-maturation phases. Manipulation of the culture conditions during the maturation can increase both quality and number of embryos produced in culture. Between factors that influence somatic embryogenesis belong growth regulators, osmotic stress and carbohydrates. Maturation is supported considerably by abscisic acid and non-penetrating osmotica (e.g. PEG). The role of carbohydrates during maturation phase has not been fully elucidated yet. Carbohydrates serve as source of energy and carbon, osmotica, participate in protection of membrane and recently it is assumed that can be signal molecules.

Presented study was made using the embryogenic line genotyp *Picea abies* AFO 541 (AFOCEL, France). Embryogenic culture was grown on Gupta and Durzan modified liquid medium supplemented with ABA and different types of carbohydrates. To contribute to elucidation of the role of carbohydrates during somatic embryo maturation four variants of maturation of SE were conducted: 1) medium with 3% sucrose and one week subcultivation interval, 2) medium with 1,57% glucose and 1,57% fructose and one week subcultivation interval, 3) medium with 3% sucrose and subcultivation every second, fourth and seventh day in a week, which lead to limitation of sucrose hydrolysis in medium, 4) medium with 3% sucrose first two days, 2,25% sucrose next two days and 1,5% sucrose next three days in week.

Substitution of sucrose in maturation medium by glucose and fructose decrease yield of mature somatic embryos. Limitation of sucrose hydrolysis in medium lead to partial decrease of yield of mature somatic embryos. However, the significant decrease in embryo yield was also observed in cultures grown on a series of media with declining sucrose/hexoses ratio and three transfers to a new medium per week. Content and spectrum of endogenous carbohydrates in somatic embryos during maturation were similar in all variants. Analysis of maturation media confirm, that sucrose presented in media is

completely hydrolyzed to glucose and fructose after one week cultivation. Dynamics of pH of media during six weeks of maturation of SE was similar in all variants. There was a decrease of pH from the first week to the lowest value in the third week of cultivation. From the fourth week, increase of pH of media until the end of the sixth week was observed. There was not statistic difference in content of storage lipids and proteins in SE after maturation among variants.

The effect of non-penetrating osmoticum PEG in maturation media on accumulation of storage proteins and lipid in somatic embryos was studied. It was found, that the content of storage lipids was higher in somatic embryos treated by PEG during maturation.

Obsah

1. ÚVOD **1**

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED **4**
2.1. VÝVOJOVÉ FÁZE SOMATICKÉ EMBRYOGENEZE JEHLIČNANŮ 4
2.1.1. Indukce tvorby embryogenní kultury 4
2.1.2. Proliferace embryogenní kultury 4
2.1.3. Zrání (maturace) somatických embryí 5
2.1.4. Desikace 5
2.1.5. Klíčení 5
2.1.6. Přeměna v rostlinu (konverze) 5
2.2. VLIV KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK NA ZRÁNÍ SOMATICKÝCH EMBRYÍ 6
2.2.1. Růstové regulátory 6
2.2.2. Osmotický potenciál média 7
2.2.3. Sacharidy 10
2.2.4. Minerální výživa 11
2.3. LÁTKY VYLUČOVANÉ DO MÉDIA 11
2.4. ZÁSOBNÍ LÁTKY V SOMATICKÝCH EMBRYÍCH 12
2.4.1. Lipidy 13
2.4.2. Proteiny 14
2.4.3. Sacharidy 16
2.5. SACHARIDY 18
2.5.1. Metabolismus sacharidů 18
2.5.2. Signální úloha sacharidů 20

3. MATERIÁL A METODY **24**
3.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL 24
3.2. KULTIVACE 24
3.3. PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ 24
3.3.1. Proliferační média 24
3.3.2. Maturační média 25
3.3.3. Germinační médium 25
3.4. ZPŮSOB KULTIVACE 27
3.4.1. Kultivace na pevném proliferačním médiu 27
3.4.2. Kultivace na tekutém proliferačním médiu 27
3.4.3. Kultivace na tekutém maturačním médiu 27
3.4.4. Desikace somatických embryí 28
3.4.5. Klíčení somatických embryí 28
3.5. VÝTĚŽEK VYTVOŘENÝCH KOTYLEDONÁRNÍCH EMBRYÍ NA KONCI ZRÁNÍ 28
3.6. STANOVENÍ pH A ODBĚR TEKUTÉHO MÉDIA 29
3.7. STANOVENÍ OBSAHU ENDOGENNÍCH ROZPUSTNÝCH SACHARIDŮ 29
3.7.1. Odběry vzorků 29
3.7.2. Extrakce sacharidů 29
3.7.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů 30
3.8. STANOVENÍ OBSAHU LIPIDŮ 30
3.9. STANOVENÍ OBSAHU PROTEINŮ 31
3.9.1. Extrakce 31
3.9.2. Stanovení obsahu 31
3.10. ZPRACOVÁNÍ DAT A STATISTICKÁ ANALÝZA 32
3.11. PŘEHLED EXPERIMENTŮ 33
3.11.1. Vliv dostupnosti sacharidů na zrání somatických embryí 33
3.11.2. Vliv osmotického potenciálu na obsah zásobních látek v somatických embryích 34

4. VÝSLEDKY **35**
4.1. VLIV DOSTUPNOSTI SACHARIDŮ NA ZRÁNÍ SOMATICKÝCH EMBRYÍ *PICEA ABIES* 35
4.1.1. Dynamika obsahu endogenních nestrukturních sacharidů v ESM a somatických embryích během proliferace, zrání a klíčení 35
4.1.2. Analýza tekutých maturačních médií během zrání somatických embryí 49
4.1.3. Změny pH maturačního média během zrání somatických embryí 62

4.1.4. Výtěžky zralých somatických embryí 66
4.1.5. Obsah zásobních látek 68
4.2. VLIV OSMOTICKÉHO STRESU NA OBSAH ZÁSOBNÍCH LÁTEK 71
4.2.1. Obsah lipidů 71
4.2.2. Obsah proteinů 72

5. DISKUZE 74
5.1. ANALÝZA TEKUTÝCH MATURAČNÍCH MÉDIÍ BĚHEM ZRÁNÍ SOMATICKÝCH EMBRYÍ 74
5.2. VÝTĚŽKY ZRALÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ 75
5.3. ZMĚNY PH MATURAČNÍHO MÉDIA BĚHEM ZRÁNÍ SOMATICKÝCH EMBRYÍ 77
5.4. DYNAMIKA OBSAHU ENDOGENNÍCH NESTRUKTURNÍCH SACHARIDŮ V ESM A SOMATICKÝCH EMBRYÍCH BĚHEM PROLIFERACE, ZRÁNÍ A KLÍČENÍ 78
5.5. OBSAH ZÁSOBNÍCH LÁTEK 79
5.5.1. Lipidy 79
5.5.2. Proteiny 80
5.6. VLIV OSMOTICKÉHO STRESU NA OBSAH ZÁSOBNÍCH LÁTEK 81

6. ZÁVĚRY 83

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 85

1. Úvod

Smrk ztepilý (*Picea abies*) patří v Evropě k hospodářsky i ekologicky významným druhům jehličnanů. V důsledku emisního poškození, okyselování a eroze půd dochází k poškozování lesních porostů. Reprodukční cyklus smrku ztepilého je relativně dlouhý, semena se tvoří obvykle až 20 let po výsadbě a semenné roky nastávají průměrně každých 5 let (Paques a kol., 1995). Vegetativní množení tradičními metodami se neosvědčilo, protože řízky špatně zakořeňují, větve rostou plagiotropně. Nevhodným způsobem množení je i regenerace celistvých rostlin *in vitro* cestou organogeneze (např. Nørgaard a Krogstrup, 1995). Další výzkum je tedy soustředěn na vegetativní množení jehličnanů pomocí somatické embryogeneze, tedy vývoje embryí ze somatických buněk. Tato metoda umožňuje získat velké množství rostlin žádaného genotypu v relativně krátkém čase a může tak významně přispět ke zlepšení stavu lesních společenstev nebo usnadnit návrat ohrožených nebo vymizelých genotypů zpět do původního prostředí. Somatická embryogeneze také představuje vhodný model pro podrobné studium zárodečného vývoje embrya. Bez ohledu na roční období umožňuje získat geneticky jednotný experimentální materiál a cíleně manipulovat s kultivačními podmínkami.

V posledních 25 letech bylo získáno mnoho poznatků o somatické embryogenezi jehličnanů. Jednotlivé fáze tohoto procesu na sebe navazují a parametry dosažené v každé z nich ovlivňují fáze následující. K důležitým změnám ve struktuře i fyziologii embrya dochází během fáze zrání. V tomto období dochází k ustavení struktury embryí a hromadění zásobních látek, které jsou potřebné pro další vývoj. Metabolismus zásobních látek je úzce spojen s metabolismem sacharidů. Vzhledem k tomu, že somatická embrya nejsou ve výživě podporována megagametofytem, jako je tomu u embryí zygotických, je velký důraz kladen na sacharidovou složku kultivačních médií. Jak ukazují výsledky některých studií (Tremblay a Tremblay, 1991; Iraqi a Tremblay, 2001a,b) sacharidy přítomné v médiu nejsou pro embryogenní kultury pouze zdrojem uhlíku a energie, ale působí také jako osmotikum a zřejmě i jako signální molekuly.

V naší laboratoři je k výzkumu využíván úspěšně zrající genotyp smrku ztepilého (*Picea abies*) AFO 541 původem z Francie. V minulých letech byla provedena základní charakterizace somatické embryogeneze z anatomického (Svobodová a kol., 1999;

Ulrychová, 2004) i z biochemického hlediska (Lipavská a kol., 2000b; Konrádová a kol., 2002; Grigová 2003; Kubeš 2004).

Cíle diplomové práce

Přispět k porozumění role sacharidů při zrání somatických embryí *Picea abies* s využitím kultivace na tekutých médiích.

Byly testovány následující hypotézy:

- **Hypotéza 1:** Typ a množství sacharidů ovlivňuje výtěžky zralých somatických embryí zrajících na tekutém médiu.
    - Stanovit výtěžky somatických embryí kultivovaných při různém zásobení sacharidy z média a kultivaci s týdenním nebo zkráceným subkultivačním intervalem během zrání.

- **Hypotéza 2:** Různá dostupnost sacharidů během zrání ovlivňuje významně obsah a zastoupení endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích.
    - Zjistit změny v obsahu a zastoupení endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích během jejich zrání, desikace a klíčení, a to za různé dostupnosti exogenních sacharidů v průběhu zrání embryogenní kultury.
    - Zjistit změny v obsahu a spektru exogenních sacharidů v tekutém maturačním médiu v průběhu zrání embryogenní kultury, a to v závislosti na počáteční koncentraci sacharidů v médiu a subkultivačním intervalu.

- **Hypotéza 3:** Během kultivace na tekutých médiích při zrání somatických embryí dochází ke změnám v pH média.

- **Hypotéza 4:** Omezení hydrolýzy sacharózy v médiu během zrání povede ke snížení obsahu zásobních látek ve zralých somatických embryích.
    - Zjistit obsah lipidů a proteinů na konci zrání somatických embryí kultivovaných na médiu s různým zastoupením sacharózy a hexóz a standardním nebo zkráceným subkultivačním intervalem.

- **Hypotéza 5:** Snížení osmotického potenciálu kultivačního média pomocí aplikace PEG má vliv na obsah zásobních proteinů a lipidů v somatických embryích *Picea abies* na konci zrání a po desikaci.

2. Literární přehled

Poprvé bylo dosaženo procesu somatické embryogeneze u mrkve (*Daucus carota*) v roce 1958 (Reinert, 1958). U jehličnanů jsou kultivační podmínky pro navození somatické embryogeneze značně odlišné a genotypově specifické. První úspěšné odvození somatických embryí jehličnanů bylo zaznamenáno u smrku ztepilého (*Picea abies*) v roce 1985 (Chalupa, 1985; Hakman a kol., 1985). Od tohoto prvního úspěchu do dnešní doby se touto problematikou zabývali mnozí autoři a bylo zjištěno velké množství poznatků. Somatická embrya se podařilo odvodit i u jiných hospodářsky významných rodů jehličnanů: *Abies*, *Pinus*, *Larix* a dalších (např. Nagmani a Bonga, 1985; Schuller a Reuther, 1993; Bozkov a kol., 1997).

2.1. Vývojové fáze somatické embryogeneze jehličnanů

Somatická embryogeneze je jeden ze způsobů vegetativního rozmnožování rostlin. Jde o vznik a vývoj bipolárních struktur – somatických embryí – ze somatických buněk. Tento proces lze rozdělit do několika fází, přičemž průběh každé z nich je závislý na fázích předchozích. Jednotlivé fáze vyžadují specifické kultivační podmínky, o kterých podrobně pojednávám v podkapitolách níže (Attree a Fowke, 1993; Gupta a Grob, 1995; Pâques a kol., 1995; von Arnold a kol., 1995):

2.1.1. Indukce tvorby embryogenní kultury

Jedná se o odvození ESM (embryonálně suspenzorové hmoty) z primárního explantátu na indukčním médiu. Nezbytnou složkou tohoto média jsou růstové regulátory auxiny (nejčastěji 2,4-D) a cytokininy (BAP, kinetin). Jako primární explantáty jsou nejvhodnější ontogeneticky mladé části rostliny, například nezralá či zralá zygotická embrya, dělohy, hypokotyl mladých semenáčků, výjimečně jehlice nebo samičí gametofyt (Gupta a Grob, 1995).

2.1.2. Proliferace embryogenní kultury

K udržování a množení již odvozené kultury se používá proliferační médium. To obsahuje také auxiny a cytokininy, avšak v nižší koncentraci. Proliferující embryogenní hmotu lze také udržovat v suspenzní kultuře, tedy bez zpevňující složky média.

Metodou zachování embryogenních kultur se schopností aktivního růstu po delší období je kryoprezervace (Kartha et al., 1988).

2.1.3. Zrání (maturace) somatických embryí

Během této fáze embryo mění svou strukturu, roste a hromadí zásobní látky. Tato fáze vyžaduje změnu kultivačních podmínek, především vynechání růstových regulátorů (auxinů a cytokininů) použitých při indukci a proliferaci. Zrání embryí je významně podpořeno kyselinou abscisovou (ABA) a snížením osmotického potenciálu média. Významnou roli hrají také sacharidy (podrobněji viz kapitola 2.2.).

2.1.4. Desikace

V průběhu této fáze dochází k částečnému vysoušení embryí při vysoké vzdušné vlhkosti. Tento proces má simulovat přirozené období snížené dostupnosti vody v semeni, které navozuje toleranci k nepříznivým podmínkám životního prostředí. Během tohoto období dochází k metabolickým změnám, které zahrnují syntézu specifických sacharidů, proteinů, degradaci mRNA typických pro fázi zrání a k degradaci endogenní kyseliny abscisové (Roberts et al., 1991; Attree a Fowke, 1993).

2.1.5. Klíčení

V této fázi desikované embryo přijímá vodu z média, prodlužuje se, především kořínek. Postupně zelená a přechází z heterotrofní na fotomixotrofní výživu. Klíčení je závislé na světelném režimu. Médium navozující zrání neobsahuje růstové regulátory, obsah sacharidů je snížen a většinou je doplněno o aktivní uhlí (Gupta a Grob, 1995).

2.1.6. Přeměna v rostlinu (konverze)

Vyklíčené embryo přechází v plně autotrofní rostlinu. Dochází k aklimaci na podmínky *ex vitro*, především na sníženou vzdušnou vlhkost a přítomnost mikroorganismů v prostředí.

2.2. Vliv kultivačních podmínek na zrání somatických embryí

Po celou dobu vývoje zygotických embryí hraje hlavní ochrannou, regulační a výživnou funkci megagametofyt. U somatických embryí kultivovaných *in vitro* musí tuto úlohu zastoupit kultivační médium a vhodný způsob kultivace. Kultivační protokoly jsou vytvářeny tak, aby vzniklá embrya dosahovala strukturální a biochemické charakteristiky, s nimiž jsou schopna se adaptovat a přežít v podmínkách *ex vitro*. Mezi faktory, které nejvýznamněji ovlivňují zrání somatických embryí, patří růstové regulátory, osmotický potenciál média, dostupnost exogenních sacharidů, minerální výživa (např. Tremblay a Tremblay, 1991; Stasolla a kol., 2002).

2.2.1. Růstové regulátory

Endogenní rostlinné hormony hrají důležitou roli během růstu semena, vývoje embrya, akumulace zásobních látek a následného klíčení a růstu rostliny.

Rostlinné růstové regulátory mají významný vliv na celý proces somatické embryogeneze. Zatímco indukce a proliferace probíhá za přítomnosti auxinu (2,4-D) a cytokininů (BAP, kinetin), zrání, desikace a klíčení somatických embryí se odehrává v jejich nepřítomnosti (Hakman a von Arnold, 1985). Při zrání somatických embryí plní nezastupitelnou roli kyselina abscisová (von Arnold a Hakman, 1988). V embryogenních kulturách jehličnanů kyselina abscisová podporuje přechod z proliferační fáze do fáze maturační a dále podporuje zrání embryí (Hakman a von Arnold, 1985). Její koncentrace v maturačním médiu je důležitým faktorem ovlivňujícím zrání somatických embryí. Optimální koncentrace v médiu se však u různých genotypů liší. U *Picea abies* se nejlépe osvědčila 7,6 µM ABA (von Arnold a Hakman, 1988), avšak v práci autorů Ruaud a kol. (1992) postačila u jiné linie *Picea abies* ABA o koncentraci 2 µM. V jiné studii bylo zdárné zrání somatických embryí *Picea abies* podpořeno kyselinou abscisovou o koncentracích 5 až 40 µM (Vágner a kol., 1998). Tito autoři dávají přednost nižším koncentracím ABA v médiu z tohoto rozmezí a kratšímu subkultivačnímu intervalu, tak aby omezili akumulaci produktů odbourávání ABA, jejichž fyziologický efekt není znám. Bozhkov a kol. (2002a) získali pěti až deseti násobný počet zralých embryí, při vynechání ABA v prvním týdnu zrání. Po tomto prematuračním ošetření kultivovali somatická embrya na médiu s ABA pět až šest týdnů.

Mezi pozitivní účinky kyseliny abscisové patří i to, že zabraňuje předčasnému klíčení embryí na maturačním médiu (Roberts a kol., 1990) a výskytu polyembryonie během zrání embryí (Boulay a kol., 1988). Dále také navozuje toleranci k desikaci (Atree a Fowke, 1993), čímž embrya připravuje pro další fáze vývoje.

Přítomnost ABA v médiu má také pozitivní vliv na akumulaci zásobních látek. Jak zjistili von Arnold a Hakman (1988), somatická embrya *Picea abies* ošetřená ABA obsahovala vyšší množství lipidů, než neošetřená varianta. Také akumulaci zásobních proteinů ABA podporuje (Hakman a kol., 1990; Roberts a kol., 1990). Zásobní proteiny u somatických embryí modřínu (*Larix leptoeuropaea*) byly detekovány ve vyšším množství pouze u varianty zrající 4 týdny na médiu s ABA (Gutman a kol., 1996).

ABA má zřejmě vliv na expresi genů kódujících LEA proteiny (late embryogenesis abundance proteins). LEA proteiny se hromadí v konečných fázích zrání embryí a některé z nich jsou zodpovědné za toleranci embryí vůči desikaci. Předpokládá se, že mj. stabilizují buněčné bílkoviny a nukleové kyseliny v období snížené dostupnosti vody (Skriver a Mudy, 1990).

2.2.2. Osmotický potenciál média

Na zrání somatických embryí jehličnanů má pozitivní vliv snížení osmotického potenciálu média. Osmotický stres podporuje a synchronizuje zrání somatických embryí, stimuluje hromadění zásobních látek, inhibuje předčasné klíčení a navozuje toleranci k následnému desikačnímu ošetření (Attree a Fowke, 1993). Snížení osmotického potenciálu média lze dosáhnout pomocí nízkomolekulárních látek (např. sacharidy), nebo pomocí vysokomolekulárních látek (např. polyetylenglykol).

2.2.2.1. Sacharidy

Nízkomolekulární látky, jimiž jsou například sacharidy, mohou pronikat přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu. Jejich osmotické působení je časově omezené. To, že přítomnost sacharidů v médiu má i částečně osmotický účinek potvrdili Tremblay a Tremblay (1991). U *Picea mariana* a *Picea rubens* nahradili médium s 6% sacharózou médiem se 3% sacharózou a ekvimolárním množstvím nemetabolizovatelných sacharidů (manitolu, sorbitolu, nebo myo-inositolu). Toto ošetření počet zralých embryí nesnížilo.

Osmotickým působením manitolu na zrání somatických embryí *Picea glauca engelmanni* se zabýval Roberts (1991). Manitol o koncentraci 2-6 % zvýšil počet globulárních embryí, ale inhiboval tvorbu kotyledonárních embryí. Kotyledonární embrya se tvořila pouze po přenosu globulárních embryí na médium bez manitolu.

V roce 1995 Tremblay a Tremblay zjistili, že se osmotický potenciál maturačního média se sacharózou (6 %) během zrání embryí *Picea mariana* mění. Analýza sacharidů v médiu odhalila, že dochází k hydrolýze sacharózy na glukózu a fruktózu. Postupnou hydrolýzou sacharózy na glukózu a fruktózu dochází ke snižování osmotického potenciálu média. Při zrání somatických embryí na médiu s kombinací 3 % glukózy a 3 % fruktózy zůstal osmotický tlak média konstantně vyšší než na médiu s 6 % sacharózy. Za těchto podmínek došlo překvapivě ke snížení počtu zralých embryí.

V dalším experimentu se Iraqi a Tremblay (2001a) pokusili zabránit úplné hydrolýze sacharózy v médiu denním přenosem embryogenní kultury *Picea mariana* a *Picea glauca* na čerstvé médium. Tímto opatřením však došlo k výraznému snížení počtu zralých embryí v porovnání s variantou nepřenášenou, kde došlo k úplnému rozštěpení sacharózy. Tento pokles nebyl zapříčiněn manipulací s ESM, jelikož denní přenos *in situ* počet embryí nijak neovlivnil. Pro ověření předpokladu, že lepší výtěžek je důsledkem zvyšujícího se osmotického tlaku média při hydrolýze sacharózy během zrání, simulovali autoři zvyšující se osmotický tlak sledem médií s různými koncentracemi glukózy a fruktózy. Překvapivě tento pokus nevedl ke zvýšení výtěžku embryí oproti médiu s konstantním osmotickým tlakem. Nejlepších výsledků tak bylo docíleno na médiu se sacharózou, jíž byla umožněna úplná hydrolýza.

2.2.2.2. Polyetylenglykol

Mezi vysokomolekulární osmotika patří polyetylenglykol. Je to organická molekula dosahující relativní molekulové hmotnosti až 8000. Omezení propustnosti buněčné stěny pro molekuly u somatických embryí *Picea glauca* je 3 nm. PEG o molekulové hmotnosti 1000 a více (nejčastěji 4000) proto může být použit jako vysokomolekulární nepenetrující osmotikum navozující osmotický stres (Attree a kol., 1995). Působení PEG napodobuje přirozený osmotický stres v semeni během posledních fází zrání. Existuje mnoho experimentů, které dokumentují kladné působení PEG na zrání somatických embryí. Attree a kol. (1991) pozorovali trojnásobný nárůst počtu zralých somatických embryí *Picea glauca* po aplikaci PEG. Tato embrya obsahovala nízké

procento vody a byla tolerantní k desikaci (Attree a kol., 1995), po desikaci se podařilo vysoké procento embryí převést v normální rostliny.

Při zrání somatických embryí *Abies numidica* se osvědčila koncentrace 7,5%-10% PEG (Vooková a Kormuťák, 2002). Další autor testoval vliv PEG-4000 v kombinaci se sacharózou, maltózou a glukózou na zrání somatických embryí hybridní jedle (*Abies alba* x *Abies numidica*). PEG-4000 stimuloval zrání somatických embryí, v závislosti na použitém zdroji sacharidů. Nejvyšší počet zralých somatických embryí byl dosažen na médiu s maltózou a PEG-4000 (Salaj a kol., 2004).

V jiných publikacích však autoři upozorňují i na negativní důsledek přítomnosti PEG během zrání. Především na sníženou schopnost takto ošetřených embryí klíčit a zdárně dokončit svůj vývoj. Důležité je zvolit vhodnou koncentraci PEG pro danou linii a genotyp jehličnanu. Například Kong a Yeung (1995) zaznamenali kladný vliv 4% PEG na zrání somatických embryí *Picea glauca*, avšak embrya zdárně neklíčila.

Přidání PEG (3,75 %) do maturačního média zkrátilo proces zrání somatických embryí *Picea abies* ze šesti týdnů na čtyři týdny. Došlo také k morfologickým změnám (embrya byla delší o 30-40 %). Při zvýšení koncentrace PEG na 7,5 % se však objevily některé morfologické abnormality (řady mrtvých buněk v embryu, ruptury v centru embrya), což vedlo k nižší klíčivosti těchto embryí (Svobodová a kol., 1999).

Bozkov a von Arnold (1998) testovali několik buněčných linií *Picea abies* a zjistili, že 7,5% PEG ve většině případů stimuloval zrání a inhiboval klíčení a raný růst kořene. Po ošetření PEG došlo ke změně morfologie embryí, byla menší, nepravidelně tvarovaná a klidové centrum kořene bylo degradované. Tyto změny vážně narušily pozdější klíčení embryí.

Mezi pozitivní vliv aplikace PEG patří zvýšení ukládání zásobních proteinů. Somatická embrya *Picea glauca* zrající v přítomnosti PEG obsahovala třikrát vyšší obsah proteinů, než neošetřená kontrola. Spektrum zásobních polypeptidů se podobalo spektru u zralých zygotických embryí (Misra a kol., 1993).

Byl zjištěn i pozitivní vliv na ukládání lipidů. Na maturačním médium se 7,5 % PEG (40 µM ABA a 3 % sacharózy) obsahovala zralá embrya pětkrát více zásobních lipidů, než obsahují embrya zygotická (Attree a kol., 1995).

Stasolla a kol. (2003a, 2003b) se ve svých studiích zabývají vlivem PEG na změnu úrovně transkripce některých genů v somatických embryích *Picea glauca*. Zjistili, že PEG například podporuje expresi genů pro chitinázu, genů pro proteiny spojené s ubiquitinem v posledních fázích vývoje embrya, dále zvyšuje transkripci genů pro

enzymy syntézy UDP-glukózy a UDP-glukuronátu. V přítomnosti PEG byla také detekována zvýšená úroveň transkripce LEA proteinů, které hrají roli v toleranci k desikaci. PEG také ovlivnil transkripci genů, které se účastní vzniku apikálních meristémů embrya, dále genů zahrnutých do katabolismu sacharózy a asimilace dusíku.

2.2.3. Sacharidy

Jednou z nejdůležitějších složek kultivačních médií jsou sacharidy. Sacharidy v médiu slouží jako zdroj energie, uhlíku, jako osmotikum a pravděpodobně i jako signální molekuly (Lipavská a Konrádová, 2004). Nelze však tyto úlohy chápat striktně odděleně, protože jsou vzájemně těsně propojeny.

Při somatické embryogenezi smrku se ze sacharidů nejlépe osvědčila sacharóza. Tremblay a Tremblay (1991) testovali účinky různých sacharidů na vývoj somatických embryí *Picea mariana* a *Picea rubens*. Embrya se vyvíjela pouze na médiích se sacharózou, fruktózou, glukózou, maltózou, nebo celobiózou. Další testované sacharidy, arabinóza, manitol, myo-inositol, nebo sorbitol zrání embryí nepodporovaly. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo na médiu s 6 % sacharózy u *Picea mariana* a s 6 % fruktózy u *Picea rubens*.

Iraqi a Tremblay (2001a) získali nejkvalitnější embrya *Picea mariana* a *Picea glauca* na médiu s 6 % sacharózy. Jak zjistili z předchozích experimentů (Tremblay a Tremblay, 1995), sacharóza byla během šesti týdenního kultivačního intervalu úplně rozložena na glukózu a fruktózu. Embrya zrající za těchto podmínek obsahovala nejvyšší množství proteinů, jejichž spektrum se podobalo spektru známému ze zygotických embryí. Takto ošetřená embrya také nejlépe klíčila. Autoři se přiklánějí k názoru, že přítomnost sacharózy a její následná hydrolýza v médiu slouží jako signál, který zvyšuje expresi genů pro zásobní proteiny (viz. kap. 2.5.2.4).

Iraqi a kol. (2005) testovali vliv 1%, 3% a 6% sacharózy na zrání somatických embryí *Picea mariana*. Nejvyšší počet normálně se vyvíjejících embryí byl pozorován u ESM zrající na 6% sacharóze. S klesající koncentrací sacharózy v médiu klesal i počet normálně se vyvíjejících embryí.

Při zrání somatických embryí *Pseudotsuga menziesii* má sacharóza také stimulační vliv na vývoj embrya, který nelze nahradit glukózou a fruktózou (Taber a kol., 1998).

Zatímco u rodu *Picea* se z dosavadních poznatků sacharóza jeví jako nejvhodnější sacharid, zrání somatických embryí rodu *Abies* podporuje jen do určité míry. Při

nízkých koncentracích sacharózy (1-3 %) embrya *Abies nordmanniana* zrála, ale při vyšší koncentraci (6 %) bylo zrání inhibováno (Nørgaard, 1997). Somatická embrya *Abies nordmanniana* a *Abies alba* zrála nejlépe v přítomnosti maltózy (Nørgaard, 1997), nebo laktózy (Schuller a Reuther, 1993). Důvodem je zřejmě pomalejší štěpení těchto sacharidů, oproti sacharóze, což vede k pomalejšímu přísunu uhlíku a energie a tato nutritivní nedostatečnost může být signálem pro spuštění maturace (Schuller a Reuther, 1993).

2.2.4. Minerální výživa

Minerální látky jsou pro úspěšné zrání somatických embryí nezbytnou složkou kultivačního média. K vývoji embryí jsou nutné jak makroprvky: N, K, Ca, Mg, P, S, tak mikroprvky: Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo.

Nejvíce ovlivňuje úspěšnost zrání somatických embryí dusík. V kultivačních médiích se jako zdroj dusíku současně kombinují anorganické a organické látky, tak aby byla zajištěna maximální podpora procesu zrání embryí. Dusík se dodává v organické podobě jako L-glutamin a v anorganické jako NH_4NO_3.

Khlifi a Tremblay (1995) testovali různé zdroje dusíku během zrání somatických embryí *Picea mariana*. Zjistili, že L-glutamin (2 až 3 g/l) je schopen podpořit zrání i bez dalšího zdroje dusíku v médiu. Za přítomnosti pouze anorganického dusíku se vytvořilo podstatně méně embryí. Se zvyšující koncentrací L-glutaminu v médiu se zvyšuje koncentrace amoniaku, který je produktem odbourávání organické formy dusíku. Vyšší koncentrace L-glutaminu v médiu působí na zrání embryí inhibičně.

Při zrání somatických embryí *Picea glauca* zjistili Barrett a kol. (1997), že zdroj dusíku ovlivňoval rychlost růstu embryogenní kultury, ale neměl vliv na počet zralých embryí. Růst ESM více podporoval dusík v organické formě, než ve formě anorganické.

Reid a kol. (1999a,b) detailně analyzovali obsah minerálních látek (K, Mg, Ca, Fe, Zn, P) v semenech a v somatických embryích *Picea glauca*. Sledované minerální látky byly nalezeny v somatických i zygotických embryích (čerstvá hmotnost) v přibližně stejném množství.

2.3. Látky vylučované do média

Analýzou kondiciovaných médií embryogenních kultur bylo zjištěno, že kultury vylučují během svého zrání některé látky do média (např.: De Jong a kol., 1992;

Egertsdotter a kol., 1993; Dyachok a kol., 2002). Patří mezi ně například arabinogalaktanové proteiny, enzymy a lipochitooligosacharidy.

Sekrece proteinů do kultivačního média suspenzních kultur byla pozorována již u řady druhů rostlin. Například pro zdárný vývoj somatických embryí u rodu *Daucus carota* je v médiu nutná glykosylovaná kyselá endochitináza, kterou produkuje do média sama kultura (De Jong a kol., 1992). Egertsdotter a kol. (1993) prokázali přítomnost extracelulárních proteinů v kultivačním médiu u několika embryonálních buněčných linií *Picea abies*. Některé zjištěné proteiny byly společné u všech studovaných linií (glykoproteiny 46, 48, 52 kDa), jiné byly specifické pro některé linie. Autoři se domnívají, že extracelulární proteiny mohou stimulovat embryogenní procesy.

Jedním z extracelulárních proteinů běžně se nacházejícím v kultivačním médiu jsou arabinogalaktanové proteiny (AGP). AGP jsou heterogenní skupinou komplexů makromolekul složených z polypeptidů, rozsáhle větvených glykanových řetězců a lipidů (Majewska-Sawka a Nothnagel, 2000). AGP jsou přítomny v buněčných stěnách a plazmatických membránách a během kultivace se uvolňují do média. Extrakt AGP z kultivačního média a ze semen *Picea abies* podpořil vývoj a zrání somatických embryí u málo embryogenních linií *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1995).

Při analýze extraktu ze zralých semen byl zjištěn protein podobný chitináze z cukrové řepy. Tento protein měl pozitivní vliv na časný vývoj somatických embryí *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1993).

Iraqi a kol. (2005) pomocí imunodetekce zjistili, že během zrání somatických embryí *Picea mariana* kultura vylučuje do média enzym, apoplastickou invertázu, která zde štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Autoři předpokládají, že invertáza stimuluje zrání somatických embryí tím, že vytváří potřebné množství hexóz, které se podílejí na vývoji embrya.

Mezi další molekuly, které jsou do média vylučovány embryogenní kulturou, patří lipochitooligosacharidy (LCO). Jde o skupinu signálních molekul, které podporují dělení rostlinných buněk. Přítomnost LCO v médiu stimuluje buněčné dělení a vývoj embryogenní kultury a somatických embryí u *Picea abies* (Dyachok a kol., 2002).

2.4. Zásobní látky v somatických embryích

Mezi zásobní látky rostlin patří tři hlavní skupiny organických molekul – sacharidy, proteiny a lipidy. Hlavními zásobními látkami v semenech jehličnanů jsou lipidy a

proteiny. Jsou uloženy v především v buňkách megagametofytu a také samotném embryu. Během klíčení a prvních fází růstu semenáčku jsou zásobní proteiny rozloženy na aminokyseliny a zásobní lipidy jsou převedeny na rozpustné sacharidy. Aminokyseliny a sacharidy jsou transportovány do semenáčku, kde slouží jako stavební kameny a zdroj energie.

Vývoj somatických embryí však probíhá bez přítomnosti megagametofytu. Množství zásobních látek, které embryo během zrání nasyntetizuje, hraje klíčovou roli v dalších fázích vývoje. Lze předpokládat, že somatická embrya s nejvyšším obsahem zásobních látek budou nejlépe prospívat při klíčení a konverzi v rostlinu (Attree a Fowke, 1991).

2.4.1. Lipidy

Lipidy (z řeckého *lipos* – tuk) jsou estery vyšších karboxylových kyselin (nasycených, nebo nenasycených) a glycerolu. Jsou to látky ve vodě nerozpustné. Rozpouští se pouze v některých organických rozpouštědlech (chloroform, etanol). Nejvýznamnějšími lipidy jsou acylglyceroly (vyšší mastné kyseliny s glycerolem), vosky (vyšší mastné kyseliny s vyššími jednosytnými alkoholy), fosfolipidy (produkty reakce vyšších mastných kyselin s fosfoglycerolem nebo fosfosfingosinem), glykolipidy (obsahují monosacharidový zbytek), lipoproteiny (vznikají spojením lipidů s bílkovinami). Podle funkce můžeme lipidy rozdělit na zásobní a strukturní. Zásobní lipidy se skládají ze směsi triacylglycerolů (TAG). Triacylglyceroly mohou obsahovat tři shodné acylové zbytky, nebo může být každá hydroxyskupina esterifikována rozdílnými mastnými kyselinami (Vodrážka, 2002).

Zásobní lipidy tvoří 30 až 50 % suché hmotnosti semen jehličnanů. Somatická embrya zpravidla obsahují nižší množství triacylglycerolů než embrya zygotická (Feirer a kol., 1989; Attree a kol., 1992).

Množství zásobních lipidů v embryích rodu *Picea* lze kladně ovlivnit přítomností ABA a PEG v maturačním médiu (Hakman a von Arnold, 1988; Feirer a kol., 1989; Attree a kol., 1992). V experimentu Attree a kol. (1994) obsahovala zralá somatická embrya *Picea glauca* tři krát vyšší množství lipidů, než zygotická embrya. Embrya byla kultivována na Petriho miskách a v bioreaktorech za přítomnosti ABA (20-50 μM) a 7,5% PEG. Vysoké procento těchto embryí (92 %) se vyvinulo v životaschopnou rostlinu.

Změna kultivačních podmínek přidáním ABA a osmotik vedla ke zvýšení obsahu lipidů i u somatických embryí jiných druhů rostlin: *Theobroma cacao* (Pence et al., 1981), *Daucus carota* (Duta a Appelqvist, 1989), *Apium graveolens* (Kim a Janick, 1991), *Brassica napus* (Avijoglu a Knox, 1989).

Při analýze mastných kyselin vázaných v TAG se zjistilo, že nejhojněji vyskytující se mastnou kyselinou v zygotických embryích a semenech *Picea glauca* byla kys. linolová (18:2). U somatických embryí se zastoupení mastných kyselin během vývoje měnilo. V nezralých somatických embryích převládaly dvě mastné kyseliny a to kys. olejová (18:1) a kys. linolová (18:2). Během zrání se obsah kys. linolové zvyšoval a ve zralých somatických embryích převládala. Zastoupení jednotlivých MK se tak u obou typů embryí ve zralosti nelišilo. Přítomnost ABA a PEG neměla vliv na zastoupení jednotlivých MK v zásobních lipidech (Attree a kol., 1992).

2.4.2. Proteiny

Podle funkce můžeme proteiny obsažené v semenech rozdělit na tři základní skupiny: strukturní proteiny (spojené s membránami a ribozomy), enzymy a zásobní proteiny. Zásobní proteiny se syntetizují v průběhu vývoje semene a poskytují základní zdroj aminokyselin pro klíčení a další růst rostliny.

Zásobní proteiny jehličnanů mohou být děleny podle molekulové hmotnosti metodou SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Touto metodou byly zásobní proteiny rozděleny na rozpustné (matrix proteins) a nerozpustné (crystalloids) (Gifford, 1988). Nerozpustné proteiny tvoří převážnou část zásobních bílkovin jehličnanů, například *Pinus* (Gifford, 1988), *Picea glauca*, *Picea engelmannii*, *Picea mariana* (Misra a Green, 1990; Roberts a kol. 1990), *Picea abies* (Hakman, 1993). U zralých semen *Picea glauca* a *Pseudotsuga menziesii* nerozpustné zásobní proteiny tvoří 70-80 % všech zásobních proteinů a jsou uloženy v proteinových tělískách (Misra a Green, 1990).

Ve zralých zygotických embryích *Picea abies* jsou nejhojněji zastoupeny zásobní proteiny o molekulové hmotnosti 42, 33 a 22 kDa (Stabel a kol., 1990). Hakman a kol. (1990) extrahovali proteiny ze zygotických a somatických embryí *Picea abies* kultivovaných *in vitro*. Zjistili, že skladba a množství proteinů jsou velmi podobné u obou typů embryí. Většina detekovaných zásobních proteinů je složena z polypeptidů

s molekulární hmotností 22, 28, 33, 42 kDa. Tyto proteiny jsou také nejhojnějšími proteiny v samičím gametofytu u zralých semen.

Zásobní proteiny shodných molekulových hmotností byly nalezeny v hojném množství také u zralých semen druhu *Picea glauca* (Roberts a kol., 1989) a u druhů rodu *Pinus* (Gifford, 1988). Tyto poznatky podporují představu o evoluční konzervovanosti zásobních proteinů jehličnanů (Hakman a kol., 1990).

Velká část zásobních proteinů je uložena v samičím gametofytu, kde se proteiny hromadí již před oplodněním. Zygotická i somatická embrya akumulují zásobní proteiny během zrání. Při klíčení jsou zásobní proteiny v obou typech embryí degradovány (Hakman a kol., 1990; Misra a kol., 1993). Stone a Gifford (1997) podrobněji pozorovali změny zásobních proteinů u semen druhu *Pinus taeda* během klíčení a časného růstu semenáčků. Během klíčení dochází k mobilizaci zásobních proteinů nejprve na kořenovém pólu embrya a poté na pólu prýtovém. V obou těchto částech dochází k hydrolýze proteinů nejprve v prokambiu a poté v buňkách pokožky.

Misra a kol. (1993) se zabývali vlivem nepenetrujícího osmotika PEG a ABA na syntézu zásobních proteinů během zrání somatických embryí *Picea glauca*. Optimální kultivační podmínky pro tvorbu embryí s vysokým obsahem zásobních proteinů byly na médiu s 16 µM ABA a 7,5 % PEG po dobu 8 týdnů a s následnou desikací. Takto ošetřená somatická embrya obsahovala třikrát více zásobních proteinů (konkrétně 4,3 µg na 1 g čerstvé hmotnosti), než embrya ošetřená pouze ABA. Spektrum zásobních polypeptidů těchto embryí a také struktura a rozdělení proteinových tělísek v buňkách bylo podobné jako u zralých zygotických embryí. Autoři se domnívají, že ošetření PEG také zamezovalo katabolismu nahromaděných polypeptidů během zrání a desikace.

Iraqi a kol. (2005) se zabývali vlivem koncentrace sacharózy v médiu při zrání *Picea mariana* na akumulaci rozpustných a nerozpustných proteinů. Embrya rostoucí na médiu s 6 % sacharózy obsahovala nejvíce proteinů. Se snižující se koncentrací sacharózy v médiu klesal i obsah rozpustných a nerozpustných proteinů v embryích.

Obdobná závislost byla pozorována u somatických embryí *Pinus strobus*. Embrya zrající 9 týdnů na maturačním médiu se 6 % sacharózy obsahovala více zásobních proteinů než na médiu se 3 % sacharózy. Prodloužení doby zrání na 12 týdnů, vedlo ke snížení obsahu proteinů u obou těchto variant (Klimaszewska a kol., 2004).

U nahosemenných rostlin můžeme vývojově regulované geny, které se exprimují během vývoje embrya, rozdělit do několika skupin (Misra, 1994). První skupinou jsou geny konstitutivně exprimované, jejichž produkty jsou přítomny ve všech stádiích

vývoje embrya, jiná skupina genů je exprimována pouze během časné embryogeneze a další skupina pouze během klíčení. Poslední skupinou jsou geny exprimované hojně v období pozdní embryogeneze (late embryogenesis abundance - LEA). LEA proteiny jsou skladovány v dehydratovaném semeni a jsou rychle degradovány během hydratace a klíčení semen (Skriver a Mundy, 1990). Obecně LEA proteiny plní ochrannou funkci v rostlinné buňce během stresových situací. Exprese většiny LEA genů je stimulována stresovým ošetřením rostliny, jako jsou poranění, zasolení, chlad, aplikace exogenní ABA. LEA proteiny jsou hydrofilní. Jejich ochranná funkce spočívá ve stabilizaci ostatních proteinů a pravděpodobně i membrán. Tímto ochranným mechanismem zřejmě působí během desikace, dormance a opětovné hydratace semen (Dure a kol., 1989). Během zrání somatických embryí má pozitivní vliv na hladinu těchto genů přítomnost ABA a osmotika (Skriver a Mudy, 1990).

2.4.3. Sacharidy

2.4.3.1. Škrob

Škrob je zásobním sacharidem u většiny vyšších rostlin. Vyskytuje se ve fotosynteticky aktivních orgánech v chloroplastech, jako tzv. asimilačmí škrob. Zásobní škrob bývá uložen v plastidech pletiv kořenů, hlízek, oddenků, cibulí a také semen. Škrob je tvořen amylózou a amylopektinem, jejichž základními stavebními kameny jsou glukózové podjednotky.

Akumulace škrobu v somatických embryích *Picea abies* začíná po přesazení ESM na maturační médium. Škrob se hromadí v buňkách suspenzoru a v amyloplastech buněk kořenové čepičky. V kotyledonárních embryích je škrob uložen v kořenové čepičce, dělohách, v kortikálních vrstvách hypokotylu. Na konci zrání se obsah škrobu výrazně snižuje (Lipavská a kol., 2000b). Tento jev byl pozorován i u zygotických embryí *Picea glauca* (Joy a kol., 1991).

Při testování vlivu koncentrace sacharózy v maturačním médiu na obsah škrobu ve zralých somatických embryích *Picea mariana*, Iraqi a kol. (2005) zjistili, že embrya zrající v přítomnosti 1 % sacharózy neobsahují žádný škrob. Oproti tomu embrya zrající v přítomnosti 3 % a 6 % sacharózy v médiu obsahují škrob, a to v přibližně stejném množství.

2.4.3.2. Sacharóza

Sacharóza představuje dočasnou zásobní látku v rostlinných buňkách. Při mobilizaci zásobních rezerv je utilizována jako první. Sacharóza je transportována na dlouhé vzdálenosti a mezi její další významné funkce patří přenos signálu a ochrana membrán při osmotickém stresu.

Sacharóza je přednostně ukládána do vakuoly. Jak potvrzují anatomicko-biochemické studie vyvíjejících se embryí *Picea abies*, se zvyšující se vakuolizací pletiv se zvyšoval i obsah sacharózy v embryích (Svobodová a kol., 1999).

2.4.3.3. Oligosacharidy rafinózové řady (RFO)

RFO jsou považovány za všudypřítomné sacharidy v rostlinách. Mezi jejich funkce patří transport na dlouhé vzdálenosti, ale mají také zásobní úlohu. Dále se předpokládá, že RFO hrají významnou roli v rostlině při toleranci vůči stresu. Přítomnost RFO je důležitá pro ochranu pletiv před poškozením dehydratací (v semenech) a také před působením chladu. V zimním období je obsah RFO v terminálním pupeni *Picea abies* výrazně vyšší, než jindy během roku (Lipavská a kol. 2000a). Ochranný mechanismus RFO spočívá v tom, že zabraňují krystalizaci sacharózy, a tím zachovávají její ochrannou funkci. Sacharóza se podílí na udržení membrán ve stavu tekutého krystalu při osmotickém stresu (chlad, sucho, zasolení) (Caffrey a kol., 1988).

Pozitivní vztah mezi obsahem RFO a tolerancí k desikaci byl pozorován u semen rostlin různých rodů, např: *Zea*, *Glycine*, *Medicago* (Obendorf, 1997). Koster a Leopold (1988) hledali vzájemný vztah mezi obsahem rozpustných sacharidů a ztrátou tolerance k desikaci u semen tří druhů rostlin (*Glycine max*, *Pisum sativum*, *Zea mays*). Zjistili, že ztráta tolerance k desikaci je spojena se snížením obsahu RFO.

V zygotických embryích *Picea abies* dochází k akumulaci RFO v pozdních fázích embryogeneze. RFO byly detekovány od 12. týdne vývoje a na konci 28. týdne tvořily téměř 50 % celkového obsahu sacharidů (Gösslová a kol., 2001).

Při procesu somatické embryogeneze hrají RFO zřejmě ochrannou roli během desikační fáze. Bomal a kol. (2002) sledovali souvislost mezi tolerancí k desikaci a obsahem sacharidů u embryí *Picea mariana*. Obsah endogenní sacharózy se během desikace měnil. Po 24 hodinách desikace embrya obsahovala dvakrát více sacharózy a po 48 hodinách více než třikrát. V této době byla také detekována rafinóza. Naopak obsah škrobu se během desikace snižoval až na jednu čtvrtinu původního obsahu. Velké

množství sacharózy a výskyt rafinózy po 48 hodinách pomalé desikace vedlo ke kompletní toleranci k desikaci a tato embrya nejlépe klíčila. Při toleranci k desikaci tak hraje významnou roli nejen přítomnost RFO, ale poměr RFO : sacharóza.

Zralá somatická embrya *Picea abies* obsahují po desikaci významná množství RFO – rafinózu a stachyózu. Akumulace sacharózy však nebyla pozorována (Kumstýřová a kol., 2000). V experimentu Konrádové a kol. (2003) byla desikace embryí nahrazena chladovým ošetřením při 4°C. Po třech týdnech v chladu, obsah RFO v embryích tvořil přibližně 20 % z celkového obsahu rozpustných sacharidů, ale obsah sacharózy se nezměnil. Vysoký obsah RFO naznačuje další roli RFO během somatické embryogeneze. Mohou sloužit jako zásobní sacharidy, zdroj energie a uhlíku během raných fází klíčení, kdy dochází k velmi rychlé degradaci RFO (Kumstýřová a kol., 2000).

2.5. Sacharidy

2.5.1. Metabolismus sacharidů

Během vývoje zygotických i somatických embryí dochází ke změnám anatomické struktury, a dále se mění i fyziologické parametry. Výrazné změny lze pozorovat v hladinách sacharidů, které hrají důležitou roli v metabolismu embryonálních buněk, mj. i při ukládání zásobních látek.

2.5.1.1. Zygotická embrya

Obsahem sacharidů během zrání zygotických embryí jehličnanů se zabývalo mnoho autorů. U druhu *Picea abies* tuto problematiku zkoumali například Gösslová a kol. (2001). Vzorky semen odebírali od května do října. V období předpokládaného opylení byl obsah nestrukturních sacharidů ve vzorcích vysoký (150-180 $\mu g.mg^{-1}$ suché hmotnosti) a spektrum sacharidů bylo tvořeno sacharózou, glukózou, fruktózou a pinitolem. Od začátku června došlo k prudkému poklesu obsahu celkových sacharidů a také ke změnám v obsahu jednotlivých sacharidů. Sacharóza začala převažovat nad hexózami a pinitol vymizel. V semenech získaných na konci června a v dalších měsících postupně rostl obsah rafinózy a stachyózy. Obsah sacharidů v izolovaných embryích byl vyšší než v ostatních pletivech semene.

U zralých semen získaných z volně rostoucích stromů *Picea glauca* převažovaly ve spektru sacharidů sacharóza a RFO (rafinóza, stachyóza, verbaskóza). Během klíčení při 25°C docházelo k poklesu RFO a sacharóza byla metabolizována na glukózu a fruktózu. Obsah hexóz tak v semeni výrazně vzrostl (Downie a Bewley, 2000).

2.5.1.2. Somatická embrya

Obsahem sacharidů během zrání somatických embryí *Picea abies* se zabývali Lipavská a kol. (2000b). Celkový obsah i spektrum endogenních nestrukturních sacharidů se během zrání embryí mění. Během proliferace obsahuje ESM především glukózu, fruktózu a v nejmenším množství sacharózu. Po přenesení ESM na maturační médium se obsah sacharidů krátkodobě zvýší, avšak v průběhu zrání dochází k jejich postupnému poklesu. Snižuje se především obsah hexóz, naopak obsah sacharózy se zvyšuje. Během zrání somatických embryí se tak zvyšuje poměr sacharóza : hexózy v celé ESM. Při analýze obsahu sacharidů ve zralých somatických embryích se zjistilo, že obsahují především sacharózu a fruktózu. Glukóza tvořila pouze 10 % z celkového obsahu sacharidů. Glukóza je tedy přednostně utilizována, slouží jako zdroj energie a uhlíku během vývoje a dále pro syntézu škrobu, později sacharózy. Obdobnou dynamiku obsahu sacharidů pozorovali také Iraqi a Tremblay (2001a) při zrání somatických embryí *Picea mariana* a *Picea glauca* na maturačním médiu se 6% sacharózou.

Během vývoje přechází embryo ze stádia aktivní metabolické struktury do stádia sinku, který akumuluje zásobní látky. Tato přeměna je spojena i se změnami v aktivitě enzymů sacharidového metabolismu (Konrádová a kol., 2002).

Dynamika obsahu nestrukturních sacharidů je v souladu se změnami v aktivitách enzymů sacharidového metabolismu. Jedním z enzymů je invertáza, která štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Obecně bývá aktivita invertázy spojena s buněčným růstem. Během proliferační fáze a v prvních dvou týdnech zrání somatických embryí *Picea abies* je aktivita invertázy nejvyšší a ke konci zrání se snižuje na velmi nízkou hodnotu (Konrádová a kol., 2002). U *Picea glauca* a *Picea mariana* došlo po přenosu kultury z proliferačního média na maturační médium s vyšším obsahem sacharózy k prudkému vzrůstu aktivity endogenních invertáz, a dále během zrání k postupnému snižování aktivity až na velmi nízkou hodnotu. Při záměně sacharózy v médiu za hexózy byla aktivita invertáz nižší (Iraqi a Tremblay, 2001a). Sacharózasyntáza katalyzuje reverzibilní přeměnu sacharózy a UDP na fruktózu a UDP-glukózu.

Poskytuje substráty pro biosyntézu škrobu, dále při procesech v dýchacím řetězci a během syntézy buněčné stěny. Aktivita sacharózasyntázy je velmi nízká během proliferace a časného zrání somatických embryí *Picea abies* a do pátého týdne vývoje postupně stoupá (Konrádová a kol., 2002). Oproti tomu u *Picea mariana* a *Picea glauca* aktivita sacharózasyntázy zůstává stabilní po celou dobu zrání na médiu se sacharózou (Iraqi a Tremblay, 2001a). Fosfoglukomutáza katalyzuje vzájemnou přeměnu mezi glukóza-1-fosfátem a glukóza-6-fosfátem. Poskytuje tak substrát pro glykolýzu a prekurzory pro syntézu mj. škrobu a lipidů. Vzhledem k intenzivnímu metabolismu embrya je aktivita fosfoglukomutázy vysoká během celého procesu zrání u zygotických i somatických embryí, a zřejmě nehraje roli důležitého kontrolního mechanismu (Konrádová a kol., 2002). Sacharózafosfátsyntáza katalyzuje reverzibilní reakci UDP-glukózy s fruktóza-6-fosfátem za vzniku sacharóza-6-fosfát a UDP. Během zrání somatických embryí *Picea mariana* a *Picea glauca* na médiu s 6% sacharózou zůstala aktivita sacharózafosfátsyntázy nezměněna (Iraqi a Tremblay, 2001a). Tito autoři se domnívají, že sacharózafosfátsyntáza spolu se sacharózasyntázou udržují konstantní buněčnou hladinu sacharózy během zrání.

Obecně lze říci, že hladina buněčné sacharózy není ovlivněna změnou zdroje sacharidů v maturačním médiu. Záměna sacharózy v médiu za ekvimolární množství glukózy a fruktózy při zrání somatických embryí *Picea glauca* a *Picea mariana* neměla vliv na endogenní hladinu sacharózy, ale obsah glukózy a fruktózy se významně zvýšil (Iraqi a Tremblay, 2001a). Autoři si zásobu sacharózy v pletivu rostoucím na médiu s glukózou a fruktózou vysvětlují její resyntézou, ke které dochází za účasti enzymů sacharózasyntázy a/nebo sacharózafosfátsyntázy. Předpokládají, že hlavní enzym podílející se na udržení konstantní hladiny sacharózy v embryích i bez její přítomnosti v médiu je sacharózasyntáza, protože její aktivita je u těchto embryí vyšší, než u embryí zrajících na médiu se sacharózou. Iraqi a kol. (2005) zjistili, že při zrání somatických embryí *Picea glauca* na médiích s 1%, 3% a 6% sacharózou byla aktivita sacharózasyntázy konstantní a nezávislá na koncentraci sacharózy v médiu.

2.5.2. Signální úloha sacharidů

U rostlin je mnoho vývojových, fyziologických a metabolických procesů regulováno alespoň z části dostupností živin. Zvláště změny v dostupnosti rozpustných sacharidů, jako je glukóza a sacharóza, se odrážejí v regulaci některých procesů (Gibson, 2004).

Mechanismus, kterým rostlinné buňky vnímají hladinu sacharidů, zatím není úplně objasněn. Mnoho informací o signální úloze sacharidů pochází ze studií na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Trumbly, 1992). U rostlin bylo zatím zjištěno několik mechanismů signalizace sacharidů, mezi něž patří hexóza-specifický mechanismus přenosu signálu závislý na hexokináze, hexóza-specifický mechanismus nezávislý na hexokináze a sacharóza-specifický přenos signálu (Smeekens a Rook, 1997).

Současné poznatky ukazují, že různé signální systémy v rostlině se vzájemně ovlivňují. Signální systém sacharidů je spojen například s působením fytohormonů (gibereliny, auxiny, cytokininy, ABA, etylen) a světla (Smeekens, 2000). Sacharidové signály mají také vliv na příjem a metabolismus dusíku. Geny kódující přenašeče dusíku a enzymy podílející se na asimilaci dusíku jsou aktivovány sacharidy (Koch, 1996).

2.5.2.1. Hexóza-specifický mechanismus přenosu signálu závislý na hexokináze

Hexokináza je dimerní cytosolický enzym, který katalyzuje první krok v glykolýze, fosforylaci glukózy. V současnosti se předpokládá, že hexokináza zároveň slouží jako senzor sacharidů a ovlivňuje expresi některých genů (Jang a Sheen, 1997). Po navázání glukózy na hexokinázu dochází ke konformační změně enzymu a spouští se signální kaskáda, vedoucí až na úroveň změny exprese některých genů. Všechny konkrétní složky této signální kaskády zatím nejsou odhaleny (Sheen a kol., 1999). Předpokládá se, že touto cestou je například inhibována transkripce mnohých genů fotosyntézy (např: pro Rubisco, enzymy Calvinova cyklu, pro tvorbu chlorofylu) při nahromadění sacharidů v listech (Smeekens a Rook, 1997). Jang a Sheen (1994) zavedli do rostlinných buněk pomocí elektroporace fosforylované sacharidy a zjistili, že tyto se na ovlivnění genové exprese nepodílely. Signál je tvořen zřejmě spíše tokem sacharidů podléhajících fosforylaci, než endogenní koncentrací fosforylovaných sacharidů.

2.5.2.2. Hexóza-specifický mechanismus přenosu signálu nezávislý na hexokináze

Analogy glukózy jako jsou 3-O-mGlc a 6-dGlc nejsou fosforylovány hexokinázou, ale přesto mohou iniciovat přenos signálu. Tato skutečnost poukazuje na existenci hexokináza nezávislého mechanismu pro vnímání a přenos informace o přítomnosti hexóz (Smeekens, 2000). Experimenty byly provedeny například u kultury buněčné suspenze *Chenopodium rubrum*, kde došlo po přidání 6-dGlc k indukci exprese genů

pro extracelulární invertázu a sacharózasyntázu (Godt a kol, 1995). U jednobuněčné zelené řasy *Chlorella kessleri* došlo vlivem 6-dGlc k indukci genů pro transportér glukózy (Hilgarth a kol., 1991). U kvasinek je mechanismus signalizace bez účasti hexokináz probádaný podrobněji. Jako senzory pro extracelulární koncentraci glukózy zde fungují proteiny SNF3 a RGT2 v cytoplazmatické membráně. Tyto proteiny jsou homologní k hexózovým transportérům, ale na přenosu se nepodílejí (Özcan a kol., 1998).

2.5.2.3. Sacharóza specifický přenos signálu

Vzhledem k tomu, že sacharóza je v rostlinách hydrolyzována na glukózu a fruktózu, je obtížné stanovit přímou signální funkci molekuly sacharózy. Jednou z možností je použití nehydrolyzovatelného analogu sacharózy. Jedním z důkazů přispívajících k potvrzení existence sacharóza specifického přenosu signálu je experiment provedený na rostlině *Arabidopsis*. Sacharóza inhibuje translaci mRNA genu ATB2. Kombinace glukózy a fruktózy, ani jiné sacharidy nemají tento účinek. V tomto případě je vnímán spíše vtok sacharózy do buňky, než koncentrace sacharózy v cytosolu, protože sacharóza syntetizovaná v buňkách jako signál nepůsobí (Rook a kol., 1998). Experiment s buněčnou kulturou *Solanum* potvrdil, že exprese genu pro sacharózasyntázu je indukována sacharózou a glukóza tento účinek nemá (Fu a Park, 1995). Tyto i další studie na toto téma naznačují, že rostliny vnímají sacharózu pomocí interních i externích receptorů (Lalonde a kol., 1999).

2.5.2.4. Signální úloha sacharidů při somatické embryogenezi jehličnanů

Signální úloha sacharidů při somatické embryogenezi není doposud uspokojivě probádána. Touto tématikou se blíže zabývají ve svých pracích pouze Iraqi a Tremblay (2001a, 2001b). Své experimenty provedli na kultuře somatických embryí *Picea glauca* a *Picea mariana*. Zjistili, že zrání těchto embryí nejlépe podporuje médium se 6% sacharózou, která během kultivačního intervalu hydrolyzuje na glukózu a fruktózu. Tato embrya obsahovala vysoký obsah proteinů a dobře klíčila. U varianty na médiu se 3,16 % glukózy a 3,16 % fruktózy získali výrazně méně embryí s nižším obsahem proteinů a sníženou klíčivostí. Stejně tak tomu bylo na médiu se 6 % sacharózy, které zabránili úplné hydrolýze denním přenosem na čerstvé médium. Tyto výsledky si autoři vysvětlují regulační funkcí sacharózy. Předpokládají, že sacharóza se při somatické embryogenezi smrku podílí na aktivaci genů pro zásobní proteiny. K zahájení této

signální cesty je však nutné rozštěpení sacharózy invertázami. Zatímco hexózy přidané do média signální úlohu plnit nemohou, hexózy vzniklé hydrolýzou sacharózy invertázami jako signál fungují (Iraqi a Tremblay, 2001b). Iraqi a Tremblay (2001a) také přepokládají, že sacharóza v médiu indukuje expresi genů pro invertázy. Po přenesení kultury z udržovacího média s 1 % sacharózy na maturační médium se 6 % sacharózy pozorovali prudký nárůst v aktivitě invertáz.

Mezi další sacharidy se signální úlohou u jehličnanů mohou být řazeny některé deriváty inositolu, jako je například pinitol (Lipavská a Konrádová, 2004). Gösslová a kol. (2001) zjistili přítomnost pinitolu na začátku vývoje zygotických embryích *Picea abies*. Přítomnost pinitolu během zrání somatických embryí nebyla pozorována (Lipavská, 2000). Gösslová a kol. (2001) se domnívají, že pinitol je přítomný pouze v megagametofytu a nepodílí se přímo na tvorbě embrya, tudíž by mohl mít jinou funkci, osmotickou, nebo signální.

Jak je patrné z předchozích kapitol, signální úloha sacharidů během somatické embryogeneze není zatím úplně objasněna. Sacharidy plní řadu funkcí v průběhu celého procesu somatické embryogeneze a bližší porozumění jejich role bude vyžadovat ještě další výzkum.

3. Materiál a metody

3.1. Rostlinný materiál

Všechny experimenty byly prováděny s embryogenní kulturou smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.), linie AFO 541. Tato kultura byla odvozena ve francouzském institutu AFOCEL z děloh pětidenních semenáčků (Galerne a kol., 1992; Ruaud a kol., 1992).

3.2. Kultivace

Udržování embryogenní kultury a všechny experimenty jsem prováděla na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (KFR PřF UK). Kultivace probíhala za sterilních podmínek v kultivačních nádobách typu Magenta (Sigma), v kultivačním boxu ve tmě při stálé teplotě 25 ± 0,5°C. Kultury jsem přesazovala za aseptických podmínek v laminárním flow-boxu.

3.3. Příprava kultivačních médií

3.3.1. Proliferační média

Pro udržování a množení embryogenní kultury jsem používala modifikované médium Gupty a Durzana (1986) obsahující 3% (w/v) sacharózu (Lachema, ČR), zpevněné 0,75% (w/v) agarem (Sigma), s růstovými regulátory 2,4-D, kinetinem a BAP (koncentrace jsou uvedeny v tab. 3.1.). Minerální živiny (složka A) jsem dodávala ze tří samostatných zásobních roztoků, které byly skladovány v lednici při teplotě 4 až 6°C. pH média jsem upravovala na 5,7 ± 0,05 a poté sterilizovala v autoklávu 20 min při 121°C a tlaku 0,144 MPa.

Zásobní roztoky organických doplňků (složka B) a růstových regulátorů (složka C) jsem po úpravě pH na 5,7 ± 0,05 sterilizovala filtrací přes membránové filtry Millipore (0,45 µm) a dále skladovala v mrazničce při teplotě -18°C. Tyto roztoky jsem do vysterilizovaného média přidávala sterilně po jeho částečném zchladnutí.

Složení a postup přípravy tekutého proliferačního média byly shodné s pevným proliferačním médiem, pouze agar jako zpevňující složka byl vynechán.

3.3.2. Maturační média

Pro navození procesu zrání somatických embryí jsem kulturu přenesla na maturační médium, které se od proliferačního média liší ve složení růstových regulátorů. Auxiny a cytokininy (složka C) jsou vynechány, místo nich je aplikována 20 µM kyselina abscisová (± cis, trans-ABA, Sigma). Zásobní roztok ABA byl připraven rozpuštěním kyseliny abscisové v 1M NaOH, pH upraveno na 6,0 ± 0,05, poté byl roztok sterilizován filtrací přes membránové filtry Millipore (0,45 µm) a uskladněn v mrazničce při –18°C. Takto připravený roztok ABA jsem sterilně přidávala do vysterilizovaného média po jeho částečném zchladnutí.

Pro navození osmotického stresu jsem používala vysokomolekulární nepenetrující osmotikum polyethylenglykol 4000 (PEG-4000, Sigma). Roztok PEGu s 400 mg/l pufru MES (Sigma) jsem připravila odděleně v polovičním objemu vody, pH jsem upravila na hodnotu 5,8 ± 0,05. Po vyklávování a částečném zchladnutí jsem roztok přilila k ostatním složkám média.

V experimentech jsem použila následující druhy a koncentrace (w/v) sacharidů v maturačním médiu:

1. 3% sacharóza (Lachema)
2. 2,25% sacharóza a 0,375% glukóza a 0,375% fruktóza (Lachema)
3. 1,5% sacharóza a 0,75% glukóza a 0,75% fruktóza (Lachema)
4. 1,57% glukóza a 1,57% fruktóza (Lachema)

3.3.3. Germinační médium

GD médium modifikované přidáním: 1% (w/v) sacharózy, 0,8% (w/v) agaru, 0,4% (w/v) aktivního uhlí, 0,015% MES, bez přidání růstových regulátorů (složka C). pH média bylo upraveno 2-3 krát vždy po 20 minutách míchání na 5,7-5,8.

Do první nádoby jsem připravila sacharózu, agar, minerální živiny (složka A) a 180 ml destilované vody. Do druhé nádobky jsem připravila aktivní uhlí, MES a 180 ml destilované vody. Obě nádoby jsem sterilizovala zvlášť. Po sterilizaci v autoklávu a částečném zchladnutí jsem sterilně oba roztoky slila a přidala organické doplňky ze

zásobního roztoku (GD-B). Za pravidelného promíchávání, aby se aktivní uhlí neusazovalo na dně láhve, jsem médium rozlila do kultivačních nádobek.

Tab. 3.1: Složky modifikovaných kultivačních médií GD (Gupta a Durzan, 1986)

Složka	**Komponenty složky**	**Koncentrace v zásobním roztoku (mg/l)**	**Finální koncentrace v médiu (mg/l)**
A - makroprvky (50 ml na 1 litr média)	NH_4NO_3	5500	275
	KNO_3	46800	2340
	$CaCl_2$	3300	166
	$MgSO_4 . 7H_2O$	3700	185
	KH_2PO_4	1700	85
A - mikroprvky (10 ml na 1 litr média)	H_3BO_3	310	3,1
	$MnSO_4 . H_2O$	845	8,45
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	491,5	4,915
	KI	41,5	0,415
	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	12,5	0,125
	$CuSO_4 . 5H_2O$	1,25	0,0125
	$CoCl_2$	0,68	0,0068
A - železo (10 ml na 1 litr média)	Na_2EDTA	1400	14
	$FeSO_4 . 7H_2O$	1900	19
B - organické doplňky (25 ml na 1 litr média)	glycin	40	1
	L-glutamin	18000	450
	kasein-hydrolyzát	20000	500
	myo-inositol	40000	1000
	kys. nikotinová	10	0,25
	pyridoxin.HCl	10	0,25
	thiamin.HCl	20	0,5
C - růstové regulátory (25 ml na 1 litr média), jen pro proliferační médium	2,4-D	44	1,1
	kinetin	17,2	0,43
	BAP	17,2	0,43
ABA (20 ml na 1 litr média), jen pro maturační médium	ABA	264	5,28

3.4. Způsob kultivace

3.4.1. Kultivace na pevném proliferačním médiu

Tento způsob kultivace jsem používala pro udržování a množení embryogenní kultury a při experimentu s PEG. Do kultivační nádoby, která obsahovala asi 25 ml pevného proliferačního média, jsem vždy pinzetou nasadila 13 kousků embryonálně-suspenzorové hmoty (EMS) o přibližné čerstvé hmotnosti jednoho kousku 100 až 150 mg. Subkultivační interval pro udržování a množení embryogenní kultury byl 1 týden. Kultivace probíhala v kultivačním boxu ve tmě při 25 ± 0,5°C.

3.4.2. Kultivace na tekutém proliferačním médiu

Tekuté proliferační médium jsem používala vždy 1 týden před nasazením embryogenní kultury na tekuté maturační médium, aby se kultura lépe přizpůsobila podmínkám tekutého média. Složení tekutého proliferačního média bylo shodné s pevným proliferačním médiem, pouze byl vynechán agar jako zpevňující složka média. Při tomto způsobu kultivace jsem použila vyšší kultivační nádobku (11 cm), než při kultivaci na pevném proliferačním médiu. Do každé kultivační nádobky jsem sterilně nalila 35 až 40 ml tekutého proliferačního média. 9 kousků ESM o přibližné hmotnosti 150 mg jsem pokládala na prámek (Osmotek, Izrael), jehož dno je tvořeno porézní tkaninou. Prámek jsem vložila do nádobky na plovák tak, aby se dno prámku dotýkalo tekutého média. Tak jsem zajistila přímý kontakt tekutého média a embryogenní kultury a zároveň jsem se vyvarovala úplnému zaplavení kultury médiem.

Kultivace probíhala v kultivačním boxu ve tmě při 25 ± 0,5°C. Po uplynutí týdenního subkultivačního intervalu jsem kulturu přenesla na tekuté maturační médium. Pomocí pinzety jsem přenesla celý prámek do připravené sterilní nádobky s plovákem a maturačním médiem.

3.4.3. Kultivace na tekutém maturačním médiu

Proces zrání somatických embryí jsem navodila přenesením kultury na maturační médium. Kultivace na tekutém maturačním médiu probíhala ve stejném uspořádání (Magenta s plovákem a prámkem), jako při kultivaci na tekutém proliferačním médiu.

Tímto způsobem jsem kulturu kultivovala 6 týdnů. Subkultivační interval a obsah sacharidů v médiu se lišil podle experimentálních variant. Kultivace probíhala v kultivačním boxu ve tmě při 25 ± 0,5°C.

3.4.4. Desikace somatických embryí

Do uzavřené Petriho misky (Ø 12 resp. 18 cm), která obsahovala 3 vrstvy filtračního papíru, jsem umístila 4 malé otevřené Petriho misky (Ø 3 resp. 4 cm), které obsahovaly jednu vrstvu filtračního papíru. Vše jsem následně vysterilizovala v autoklávu.

Ve sterilních podmínkách jsem do Petriho misky na trojvrstvý filtrační papír nalila cca 7 ml sterilní destilované vody, na suchý filtrační papír ve vnitřních menších miskách jsem horizontálně umístila 30 – 50 somatických embryí. Uzavřenou velkou Petriho misku jsem utěsnila dvěma vrstvami parafilmu.

Desikace probíhala v kultivačním boxu za světla (fotoperioda 16h a ozářenost 200 mmol/m^2.s) a při 25 ± 0,5°C po dobu 3 týdnů. Přibližně jednou za 7 dní jsem kontrolovala vlhkost uvnitř Petriho misky. V případě nutnosti jsem za sterilních podmínek dolila sterilní vodu do Petriho misky, kterou jsem opět utěsnila parafilmem.

3.4.5. Klíčení somatických embryí

Po ukončení desikace jsem jednotlivá embrya přenesla pinzetou za sterilních podmínek do kultivační nádobky s cca 50 ml germinačního média. Do každé nádobky jsem nasadila asi 50 jednotlivých embryí. Klíčení probíhalo 3 týdny v kultivační místnosti s konstantní teplotou 25 ± 0,5°C a světelným režimem 16 h světlo/8 h tma a ozářeností 45 mmol/m^2.s.

3.5. Výtěžek vytvořených kotyledonárních embryí na konci zrání

Před nasazením z proliferačního na maturační médium jsem zvážila čerstvou hmotnost nasazované ESM v jednotlivých kultivačních nádobkách. Morfologicky normální embrya jsem spočítala na konci šestého týdne zrání v každé nádobce zvlášť. Počet embryí jsem následně přepočítala na 1 gram výchozí čerstvé hmotnosti ESM.

3.6. Stanovení pH a odběr tekutého média

Stanovení pH tekutého média jsem prováděla pomocí laboratorního pH metru vždy na konci subkultivačního intervalu u čtyř náhodně vybraných kultivačních nádobek od každé experimentální varianty. Před měřením jsem celý obsah tekutého média promíchala v kultivační nádobce pomocí magnetického míchadla. Po změření pH jsem z těchto kultivačních nádobek odebrala 1 ml média. Tyto vzorky jsem dále nezpracovávala a uložila jsem je do mrazničky při -20°C, kde byly připraveny k měření obsahu sacharidů pomocí HPLC.

3.7. Stanovení obsahu endogenních rozpustných sacharidů

3.7.1. Odběry vzorků

Vzorky jsem odebírala do předem zvážených mikrozkumavek, z náhodně zvolené kultivační nádobky vždy v den, kdy uplynul týdenní subkultivační interval. Od 1.týdne do 4.týdne zrání jsem odebírala ESM (cca 200 mg/vzorek), od 5.týdne zrání jsem odebírala zvlášť ESM a zvlášť extirpovaná embrya (150-200 mg/vzorek).

Další vzorky jsem odebrala na konci desikace a v průběhu klíčení (po 3, 7, 14, 21 dnech klíčení).

Bezprostředně po odebrání jsem vzorky zvážila pro zjištění čerstvé hmotnosti a ihned zmrazila v kapalném dusíku. Před dalším zpracováním jsem vzorky uložila v mrazícím boxu při teplotě -80°C.

3.7.2. Extrakce sacharidů

Vzorky embryí a ESM jsem nejprve lyofilizovala v zařízení Lyovac GT 2 (Finn-Aqua) 12 až 14 hod, a poté jsem je zvážila pro zjištění suché hmotnosti.

Extrakci sacharidů jsem provedla takto:

1) inkubace s 0,5 ml 80% methanolu (v/v) při 75°C – 15 min
2) odpaření methanolu ve vakuu (Speedvac Plus SC110 A, Savant) – 3 hod
3) přidání demineralizované vody (MilliQ) podle suché hmotnosti vzorku

<5 mg ..... 0,3 ml

5 až 10 mg …. 0,5 ml

10 až 20 mg ….. 1,0 ml

20 až 30 mg ..... 1,5 ml

4) ultrazvuková lázeň (Julabo USR 05) – 15 min
5) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 g – 10 min

Po centrifugaci jsem odebrala supernatant a filtrovala ho přes membránové filtry Millipore (0,22 µm) do čistých mikrozkumavek. Před stanovením obsahu sacharidů pomocí HPLC jsem vzorky uchovávala při teplotě -18°C.

3.7.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů

Sacharidy jsem stanovovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry měřícího systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-71); isokratická pumpa Spektra Physics; integrace: počítačový program CSW 1.7; předklonky Hema-Bio 1000 SB+Q (Watrex); kolona Polymer IEX 8 µm Pb^{2+} (Watrex); teplota 80°C; nebo předkolona SugarPak (Waters), teplota 90°C; eluent: demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku 0,5 ml/min; objem injikovaného vzorku: 10 µl; standardy: Sigma.

3.8. Stanovení obsahu lipidů

K lyofilizovanému vzorku o minimální suché hmotnosti 30 mg jsem přidala 0,5 ml extrakční směsi (methanol a chloroform v poměru 1:1) a důkladně jsem protřepala (Vortex). Extrakt jsem přefiltrovala pomocí injekční stříkačky se smotkem vaty na jehle a převedla do nové předem zvážené mikrozkumavky. Tento postup filtrace jsem u každého vzorku opakovala 3krát. Poté jsem otevřené mikrozkumavky s přefiltrovanými extrakty nechala odpařit 4 dny v digestoři. Následně jsem mikrozkumavky zvážila. Celkovou hmotnost lipidů u jednoho vzorku jsem stanovila jako rozdíl mezi původní hmotností mikrozkumavky a hmotností mikrozkumavky po odpaření extraktu v digestoři.

3.9. Stanovení obsahu proteinů

3.9.1. Extrakce

Při extrakci jsem používala tyto pufry:

- **Pufr I.**

100 ml tohoto pufru obsahovalo 10 g sacharózy, 2 tablety Complete EDTA-free, 1,97 g TRIS-HCl. Při teplotě 4°C jsem upravila pH na 6,8.

- **Pufr II.**

100 ml tohoto pufru obsahovalo 10 g sacharózy, 1 g sodium dodecyl sulfátu, 2 tablety Complete EDTA-free, 1,97 g TRIS-HCl. Při 20°C jsem pH upravila na 6,8.

Pro extrakci rozpustných proteinů jsem používala pufr I (přidala jsem inhibitor proteáz PMSF – 10 μl roztoku PMSF(100 mM)/1 ml pufru). Po celou dobu extrakce jsem vzorek udržovala na ledu. Po přidání 0,1 ml extrakčního pufru jsem vzorek homogenizovala na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 3 krát 3 minuty při frekvenci 5 Hz. Poté jsem přidala 0,5 ml pufru I (již bez PMSF) a centrifugovala při 5°C, 14 000 g, 15 min. Pomocí pipety jsem supernatant odsála z eppendorfky. Tímto způsobem jsem získala extrahované rozpustné proteiny.

K peletu po extrakci rozpustných proteinů, jsem již za pokojové teploty, přidala 1,0 ml extrakčního pufru II (přidala jsem inhibitor proteáz PMSF). A dále jsem přidala 0,5 ml extrakčního pufru II bez inhibitoru proteáz PMSF a 20 min protřepala na automatické třepačce. Poté jsem vzorky centrifugovala při 20°C, 14 000 g, 15 min. Supernatant jsem odsála z eppendorfky pomocí pipety. Tímto způsobem jsem získala extrahované nerozpustné proteiny.

3.9.2. Stanovení obsahu

Samotné stanovení obsahu rozpustných a nerozpustných proteinů jsem prováděla spektrofotometricky (Helios α). Připravila jsem si dvě kalibrační řady pomocí Bovine Serum Albumine (2,5 mg BSA/1 ml pufru I nebo pufru II) podle tabulek 3.2 a 3.3.

Tab. 3.2: I. kalibrační řada:

0 µl BSA	1 µl BSA	2 µl BSA	3 µl BSA	4 µl BSA	5 µl BSA	6 µl BSA
200 µl pufru I	199 µl pufru I	198 µl pufru I	197 µl pufru I	196 µl pufru I	195 µl pufru I	194 µl pufru I

Tab 3.3: II. kalibrační řada:

0 µl BSA	1 µl BSA	2 µl BSA	3 µl BSA	4 µl BSA	5 µl BSA	6 µl BSA
200 µl pufru II	199 µl pufru II	198 µl pufru II	197 µl pufru II	196 µl pufru II	195 µl pufru II	194 µl pufru II

S kalibračními řadami jsem prováděla stejné kroky jako se vzorky. Každý vzorek jsem z důvodu kontroly stanovovala dvakrát. Do nové eppendorfky jsem přidala 5 µl vzorku a 195 µl pufru I (rozpustné proteiny) nebo pufru II (nerozpustné proteiny). Dále jsem přidala 800 µl barvícího roztoku (připraveného takto: 90 ml etanolu, 10 ml kyseliny octové a 50 mg barviva Amidoblack) a protřepala na Vortexu a nechala 15 min stát. Poté jsem vzorky centrifugovala při 20°C, 18 000 otáček/min, 10 min. Supernatant jsem odlila a hrdlo eppendorfky otřela. Následně jsem odstranila barvivo pomocí 1 ml odbarvovacího roztoku (připraveného takto: 90 ml etanolu a 10 ml kyseliny octové), protřepala a nechala 15 min stát. Po centrifugaci při 20°C, 18 000 otáček/min, 10 min jsem supernatant odlila. K peletu jsem přidala 1 ml 0,1 M NaOH a protřepala 1 min na třepačce. U takto připraveného vzorku jsem změřila absorbanci (λ=615nm) a získané hodnoty přepočítala na obsah proteinů ve vzorku.

3.10. Zpracování dat a statistická analýza

Základní početní operace při zpracování dat (průměr, směrodatná odchylka apod.) jsem prováděla v programu Microsoft Excel. Statistickou analýzu (ANOVA) jsem provedla v programu NCSS 2001.

3.11. Přehled experimentů

3.11.1. Vliv dostupnosti sacharidů na zrání somatických embryí

Zrání somatických embryí na tekutém maturačním médiu po dobu 6-ti týdnů, s rozdílnými subkultivačními intervaly a s rozdílnou koncentrací sacharidů v médiu. Jednotlivé experimentální varianty jsou vysvětleny v následujících tabulkách 3.4 a 3.5.

Tab. 3.4: Experimentální varianty

Varianta	subkult. interval	koncentrace sacharidů v médiu
S	1 týden	3% sacharóza
G+F	1 týden	1,57% glukóza a 1,57% fruktóza
S↑	2 dny, 2 dny, 3dny	viz. tab. 3.5
G+F↑	2 dny, 2 dny, 3dny	viz. tab. 3.5

Tab. 3.5: Koncentrace sacharidů v médiích u přenášených variant S↑ a G+F↑

Varianta	subkult. interval (dny)	koncentrace sacharidů v dodaném médiu: PONDĚLÍ	koncentrace sacharidů v dodaném médiu: STŘEDA	koncentrace sacharidů v dodaném médiu: PÁTEK
S↑	2, 2, 3	3% sacharóza	3% sacharóza	3% sacharóza
G+F↑	2, 2, 3	3% sacharóza	2,25% sacharóza a 0,375% glukóza a 0,375% fruktóza	1,5% sacharóza a 0,75% glukóza a 0,75% fruktóza

- Varianta **S** přestavuje kontrolní variantu, somatická embrya byla kultivována standardním způsobem.
- U varianty **G+F** zrají somatická embrya bez přítomnosti sacharózy v médiu.
- U přenášené varianty **S↑** jsem se přenosem embryogenní kultury na čerstvé médium třikrát týdně pokusila zabránit úplné hydrolýze sacharózy v médiu.
- U přenášené varianty **G+F↑** jsem přenosem embryogenní kultury třikrát v průběhu týdne na čerstvé médium se snižujícím se obsahem sacharózy simulovala snižující se obsah sacharózy v médiu během týdenního subkultivačního intervalu, ke kterému dochází při kultivaci standardním způsobem (jako u varianty S). Zároveň ostatní složky kultivačního média (ABA, organické doplňky, minerální látky) byly dodávány s čerstvým médiem třikrát týdně (jako u varianty S↑).

V tomto experimentu jsem stanovila: výtěžky zralých somatických embryí, obsahy nestrukturních sacharidů v somatických embryích během zrání, desikace a klíčení,

hodnoty pH a obsahy sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí, obsahy lipidů a proteinů na konci zrání somatických embryí.

3.11.2. Vliv osmotického potenciálu na obsah zásobních látek v somatických embryích

Zrání somatických embryí na pevném maturačním médiu po dobu 6-ti týdnů, subkultivační interval 1 týden, dvě experimentální varianty: základní maturační médium s 5% PEG a kontrolní varianta bez přidání PEG (0% PEG).

V tomto experimentu jsem stanovila obsah lipidů a proteinů na konci zrání a po desikaci.

4. Výsledky

Pro přehlednost jsou v následujícím textu jednotlivé experimentální varianty uváděny pouze zkratkami (S, G+F, S↑, G+F↑). Podrobné vysvětlení uspořádání experimentu je uvedeno na straně 33 v tabulkách 3.4 a 3.5.

4.1. Vliv dostupnosti sacharidů na zrání somatických embryí *Picea abies*

Pro sledování vlivu dostupnosti sacharidů při zrání somatických embryí *Picea abies* na výtěžky embryí, obsah sacharidů, proteinů a lipidů v embryích a na obsah sacharidů v kultivačním médiu a na změny pH kultivačního média jsem testovala čtyři experimentální varianty zrání somatických embryí – S, G+F, S↑, G+F↑ – s rozdílným zásobením sacharidy a subkultivačními intervaly během období zrání.

Vzhledem k častému přenášení kultur na čerstvé médium a citlivosti tekutých médií ke kontaminaci, jsem neměla vždy dostatek materiálu pro odběry ve všech naplánovaných fázích vývoje u všech experimentálních variant ve všech opakováních.

4.1.1. Dynamika obsahu endogenních nestrukturních sacharidů v ESM a somatických embryích během proliferace, zrání a klíčení

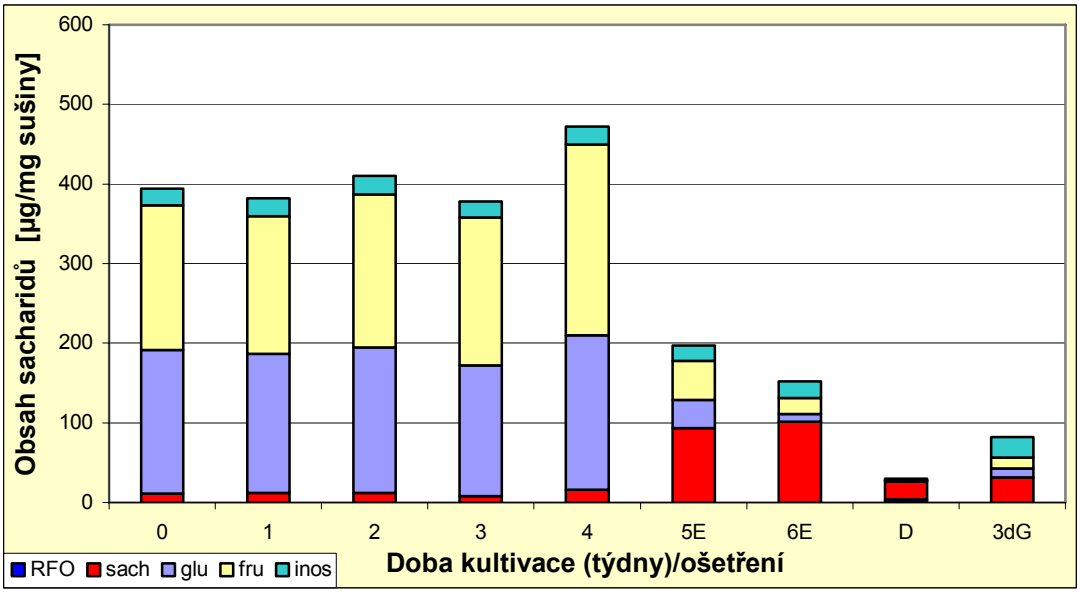
U experimentálních variant (S, G+F, S↑, G+F↑) jsem sledovala obsah endogenních nestrukturních sacharidů na konci prvního až čtvrtého týdne zrání v ESM, dále na konci pátého a šestého týdne zrání, po desikaci a během klíčení v izolovaných embryích. V průběhu zrání a klíčení somatických embryí *Picea abies* všech variant docházelo k výrazným změnám v celkovém obsahu sacharidů a v zastoupení jednotlivých složek sacharidového spektra. Změny v obsahu a spektru sacharidů byly v základních rysech podobné u všech experimentálních variant.

První čtyři týdny zrání byla ESM charakterizována relativně vysokým obsahem endogenních nestrukturních sacharidů (přibližně 400 µg/mg sušiny), nízkým obsahem sacharózy a vysokým podílem hexóz ve spektru. Zastoupení glukózy a fruktózy bylo zhruba rovnoměrné. V izolovaných embryích v pátém a šestém týdnu zrání byl obsah endogenních nestrukturních sacharidů nižší (přibližně 200 µg/mg sušiny) a

nadpoloviční část spektra sacharidů byla tvořena sacharózou. Spektrum sacharidů bylo dále tvořeno glukózou, fruktózou a inositolem. Celkový obsah sacharidů v izolovaných embryích v průběhu zrání (4. až 6. týden) pozvolna klesal. V prvním opakování experimentu jsem stanovila obsah sacharidů také ve zbytkové hmotě po odběru embryí ve čtvrtém, pátém a šestém týdnu zrání. Zbytková hmota obsahovala přibližně 400 µg sacharidů/mg sušiny a spektrum sacharidů bylo tvořeno především hexózami, sacharóza tvořila minimální část spektra. Na konci desikace embrya obsahovala přibližně 30-70 µg sacharidů/mg sušiny a spektrum sacharidů tvořily především sacharóza, RFO a v menším zastoupení inositol, glukóza a fruktóza. V průběhu klíčení byl obsah sacharidů nízký (přibližně do 100 µg/mg sušiny) a spektrum bylo tvořeno sacharózou, inositolem, fruktózou a glukózou.

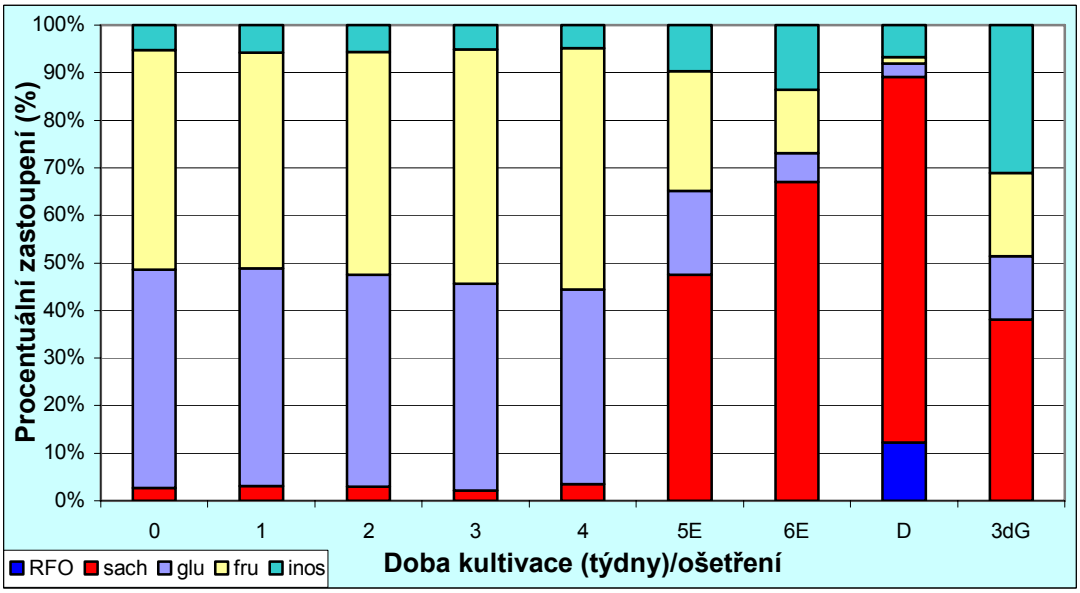
Graf 1: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta S</u>; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG – embrya po 3 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4 (pozn. pro hodnoty v tabulce označené * n = 1).

A



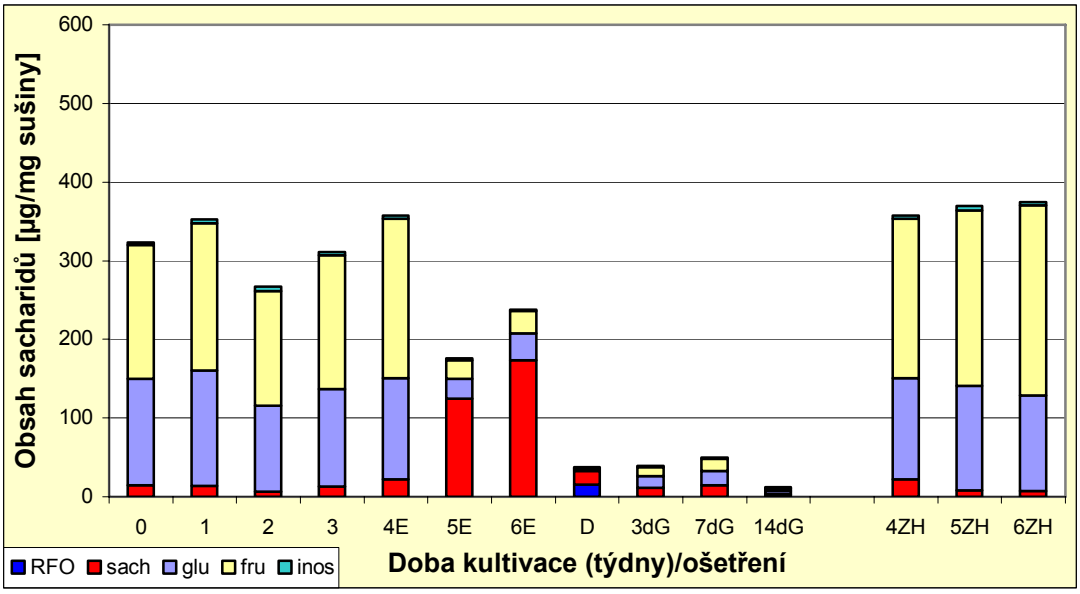
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	10,86 ± 2,75	180,57 ± 21,30	181,70 ± 20,78	20,66 ± 2,16	393,8 ± 43,06
1. týden	0	11,76 ± 2,35	174,83 ± 14,74	173,25 ± 15,14	22,01 ± 2,21	381,85 ± 34,06
2. týden	0	11,91 ± 2,95	183,04 ± 22,25	191,95 ± 31,75	23,18 ± 3,22	410,08 ± 54,49
3. týden	0	8,03 ± 2,96	164,42 ± 33,18	185,73 ± 31,83	19,46 ± 3,56	377,63 ± 68,71
4. týden	0	16,39 ± 4,35	193,32 ± 18,25	239,86 ± 18,84	22,79 ± 1,71	472,35 ± 34,86
5. týden (E)	0	93,61 (*)	34,77 (*)	49,66 (*)	18,99 (*)	197,02 (*)
6. týden (E)	0	101,65 ± 3,13	9,29 ± 4,61	20,06 ± 7,68	20,68 ± 0,16	151,68 ± 13,07
desikace	3,66 ± 0,06	22,87 ± 2,43	0,86 ± 0,34	0,40 ± 0,07	2,00 ± 0,39	29,79 ± 2,38
3 dny klíčení	0	31,31 ± 3,61	10,98 ± 0,71	14,41 ± 1,05	25,59 ± 1,80	82,28 ± 0,05

B



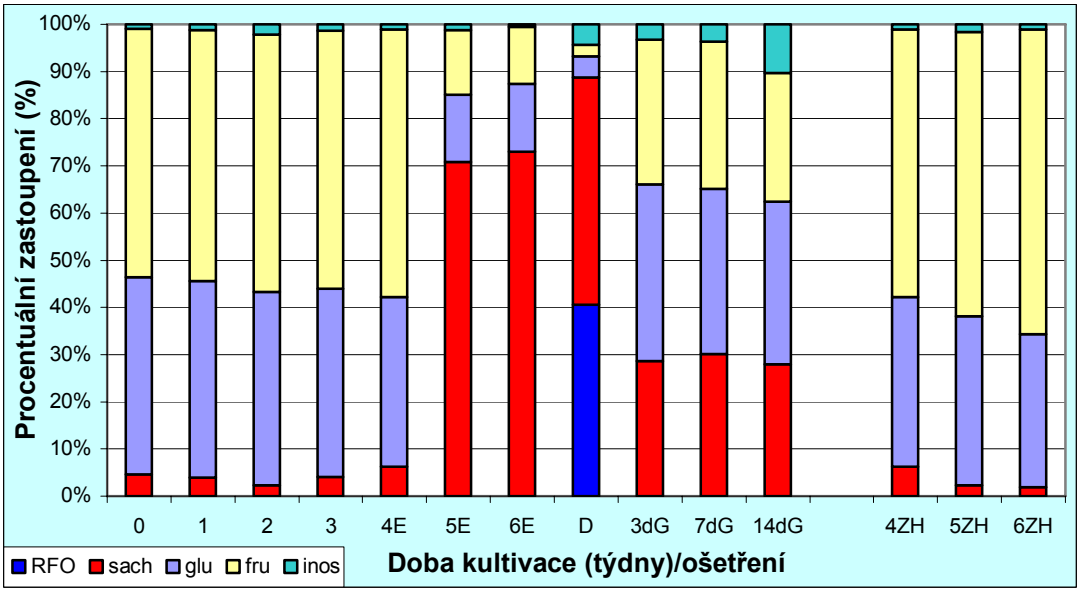
Graf 2: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta S</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG, 14dG – embrya po 3, 7, 14 dnech klíčení; 4ZH, 5ZH,... – 4., 5. týden zrání, zbytková hmota. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



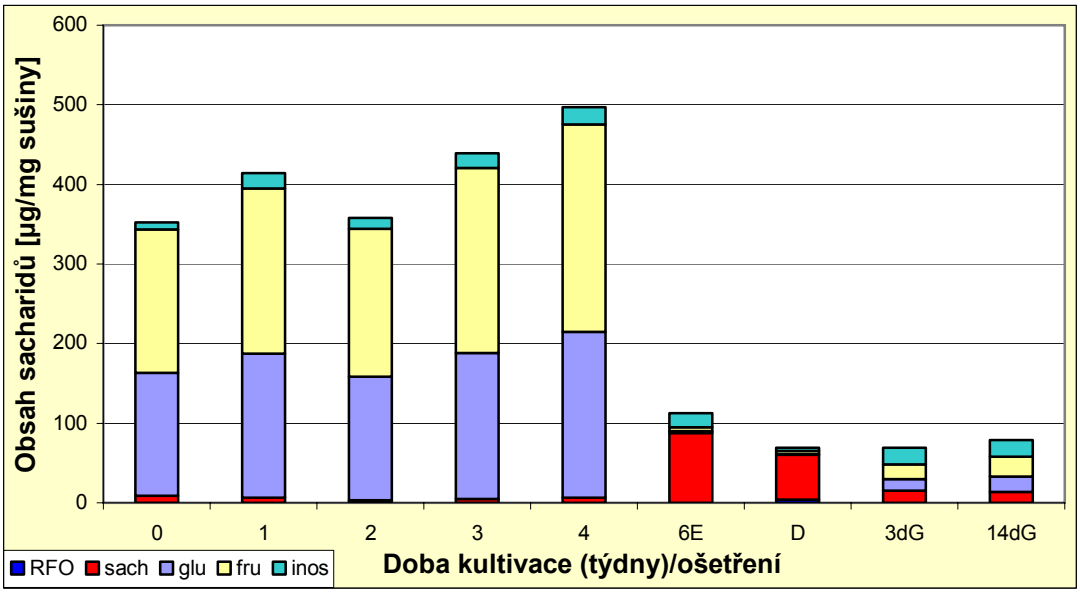
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	14,89 ± 2,60	135,29 ± 7,76	169,94 ± 10,04	3,06 ± 0,78	323,18 ± 20,69
1. týden	0	13,95 ± 2,90	146,53 ± 16,53	187,47 ± 21,51	4,35 ± 0,92	352,31 ± 38,64
2. týden	0	6,33 ± 0,69	109,29 ± 17,41	146,06 ± 19,27	5,66 ± 1,83	267,35 ± 35,67
3. týden	0	12,65 ± 4,72	123,80 ± 10,78	170,16 ± 12,91	4,01 ± 1,85	310,61 ± 25,11
4. týden (E)	0	22,08 ± 8,36	128,38 ± 32,47	202,52 ± 43,89	4,03 ± 1,69	357,01 ± 83,68
5. týden (E)	0	124,57 ± 25,94	25,09 ± 4,15	24,06 ± 3,90	2,07 ± 0,53	175,79 ± 31,66
6. týden (E)	0	173,45 ± 47,53	34,03 ± 10,48	28,78 ± 6,47	1,28 ± 0,39	237,55 ± 63,68
desikace	15,10 ± 5,04	17,86 ± 7,39	1,67 ± 0,76	0,91 ± 0,04	1,62 ± 0,55	37,16 ± 7,64
3 dny klíčení	0	11,16 ± 1,72	14,65 ± 3,11	11,95 ± 3,24	1,29 ± 0,77	39,05 ± 8,31
7 dní klíčení	0	14,93 ± 3,25	17,39 ± 0,74	15,47 ± 1,09	1,84 ± 0,48	49,63 ± 3,88
14 dní klíčení	0	3,37 ± 1,22	4,17 ± 2,19	3,30 ± 1,89	1,24 ± 0,59	12,08 ± 5,66
4ZH	0	22,08 ± 8,36	128,38 ± 32,47	202,52 ± 43,89	4,03 ± 1,69	357,01 ± 83,68
5ZH	0	8,37 ± 2,93	132,45 ± 7,40	222,78 ± 8,94	5,95 ± 1,65	369,55 ± 14,95
6ZH	0	7,04 ± 4,65	121,27 ± 11,68	241,81 ± 21,18	4,13 ± 0,98	374,24 ± 35,2

B



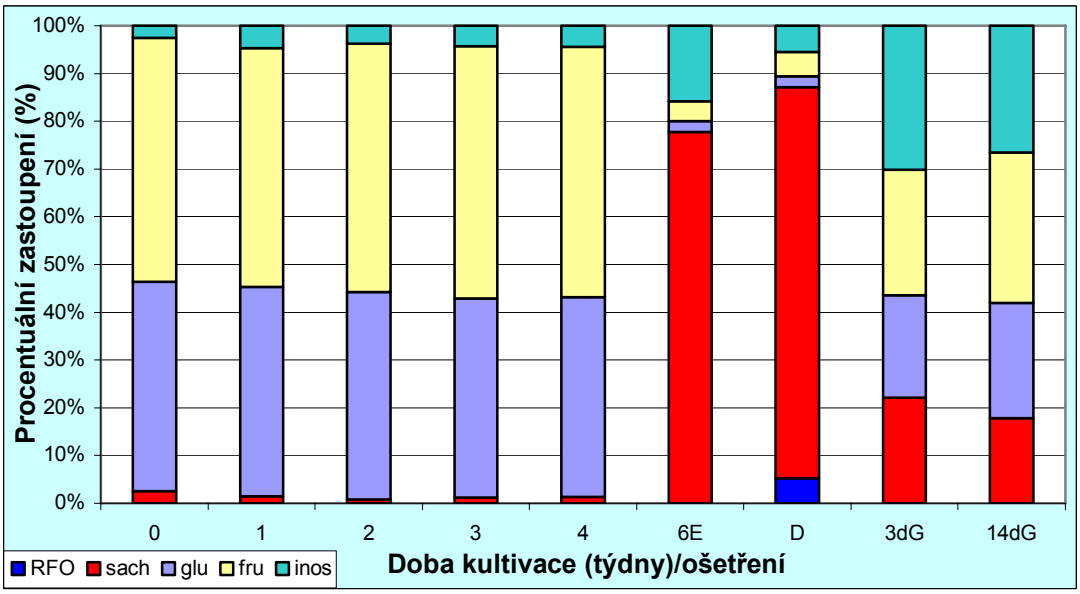
Graf 3: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta S</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci, 3dG, 14dG – embrya po 3, 14 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



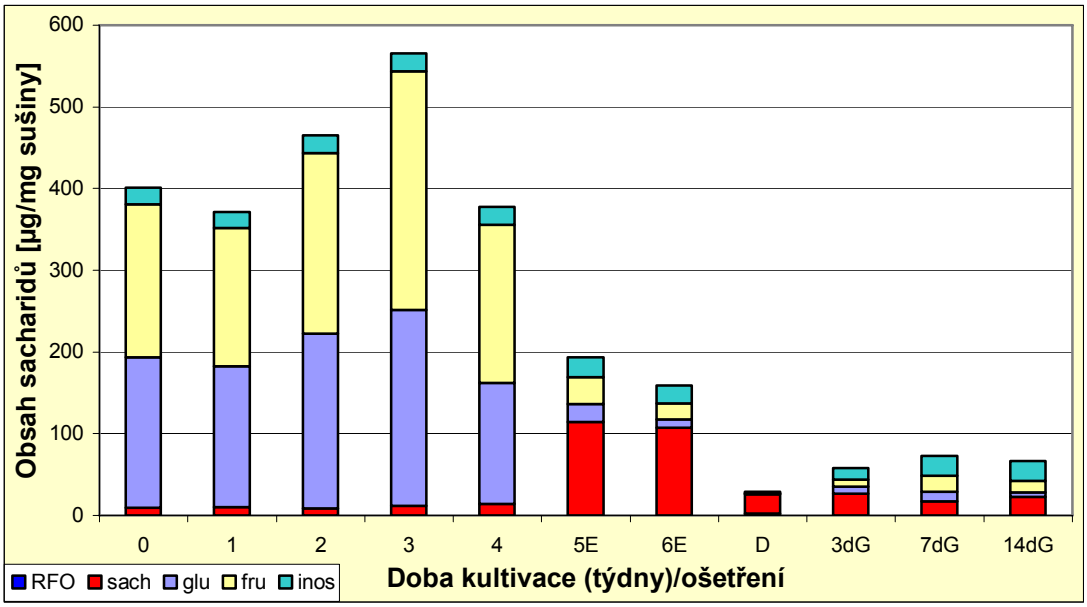
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	8,96 ± 1,85	154,34 ± 19,09	180,05 ± 22,95	8,99 ± 2,32	352,34 ± 44,45
1. týden	0	6,37 ± 1,52	181,02 ± 34,21	207,23 ± 41,48	19,29 ± 5,03	413,90 ± 81,94
2. týden	0	3,04 ± 0,44	155,31 ± 38,37	186,20 ± 50,60	13,59 ± 4,97	358,14 ± 93,81
3. týden	0	5,20 ± 2,87	182,87 ± 36,63	232,20 ± 44,86	18,70 ± 3,29	438,98 ± 85,72
4. týden	0	6,81 ± 4,30	208,20 ± 31,03	260,29 ± 38,54	22,14 ± 3,34	497,45 ± 68,91
6. týden (E)	0	87,46 ± 7,22	2,63 ± 1,69	4,59 ± 1,93	17,82 ± 4,42	112,50 ± 10,75
desikace	3,63 ± 4,20	56,31 ± 22,75	1,53 ± 0,53	3,52 ± 2,06	3,81 ± 1,15	68,79 ± 22,90
3 dny klíčení	0	15,25 ± 4,75	14,90 ± 3,73	18,17 ± 7,00	20,82 ± 4,75	69,15 ± 11,89
14 dní klíčení	0	13,99 ± 5,22	18,94 ± 6,52	24,75 ± 8,11	20,81 ± 10,66	78,48 ± 21,92

B



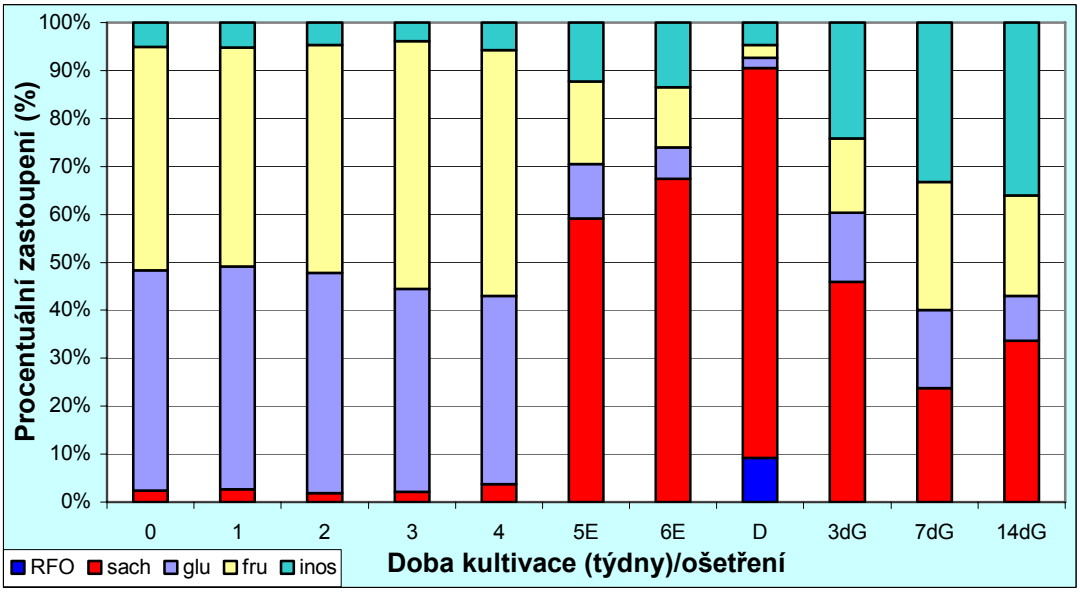
Graf 4: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, varianta G+F; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG, 14dG – embrya po 3, 7, 14 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



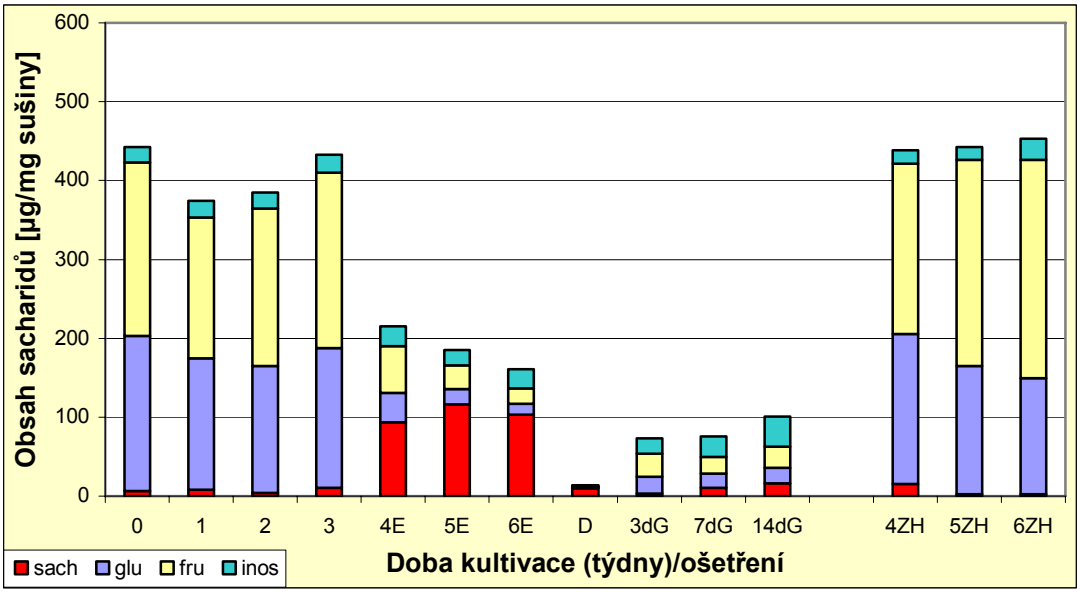
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	9,60 ± 0,53	183,95 ± 18,56	186,95 ± 18,34	20,29 ± 2,32	400,80 ± 38,63
1. týden	0	9,97 ± 3,83	172,41 ± 34,1	169,46 ± 32,91	19,55 ± 3,33	371,39 ± 67,93
2. týden	0	8,48 ± 2,53	214,06 ± 34,17	220,88 ± 34,79	21,76 ± 5,73	465,18 ± 76,25
3. týden	0	11,98 ± 1,81	239,63 ± 24,74	292,06 ± 15,38	21,56 ± 0,25	565,22 ± 20,82
4. týden	0	14,05 ± 6,91	148,24 ± 16,94	193,42 ± 23,24	21,69 ± 4,41	377,39 ± 50,37
5. týden (E)	0	114,26 (*)	21,86 (*)	33,42 (*)	23,69 (*)	193,22 (*)
6. týden (E)	0	107,08 ± 8,73	10,32 ± 4,04	19,92 ± 5,30	21,39 ± 2,02	158,71 ± 12,97
desikace	2,66 ± 0,26	23,48 ± 3,76	0,59 ± 0,28	0,78 ± 0,28	1,35 ± 0,45	28,86 ± 4,34
3 dny klíčení	0	26,65 ± 5,73	8,42 ± 1,52	8,98 ± 2,73	14,01 ± 4,62	58,06 ± 12,98
7 dní klíčení	0	17,24 ± 1,03	11,09 ± 1,48	19,38 ± 2,26	24,13 ± 1,65	72,65 ± 4,19
14 dní klíčení	0	22,35 ± 1,02	6,22 ± 0,55	13,90 ± 2,75	23,98 ± 0,71	66,46 ± 2,93

B



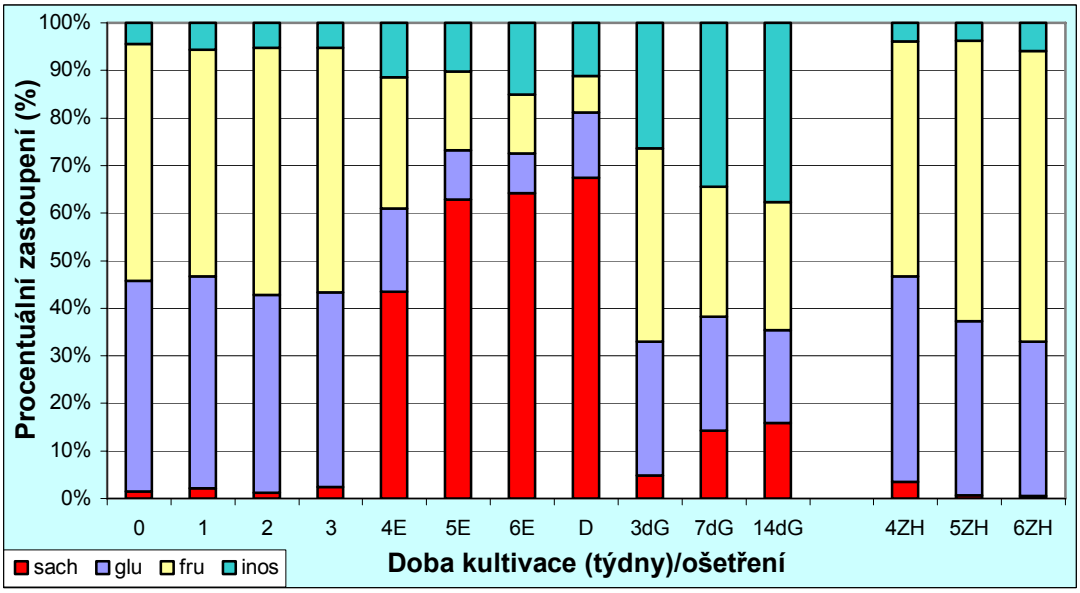
Graf 5: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta G+F</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 5E, 6E – izolovaná embrya; 4ZH, 5ZH,... – 4., 5. týden zrání, zbytková hmota; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG, 14dG – embrya po 3, 7, 14 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



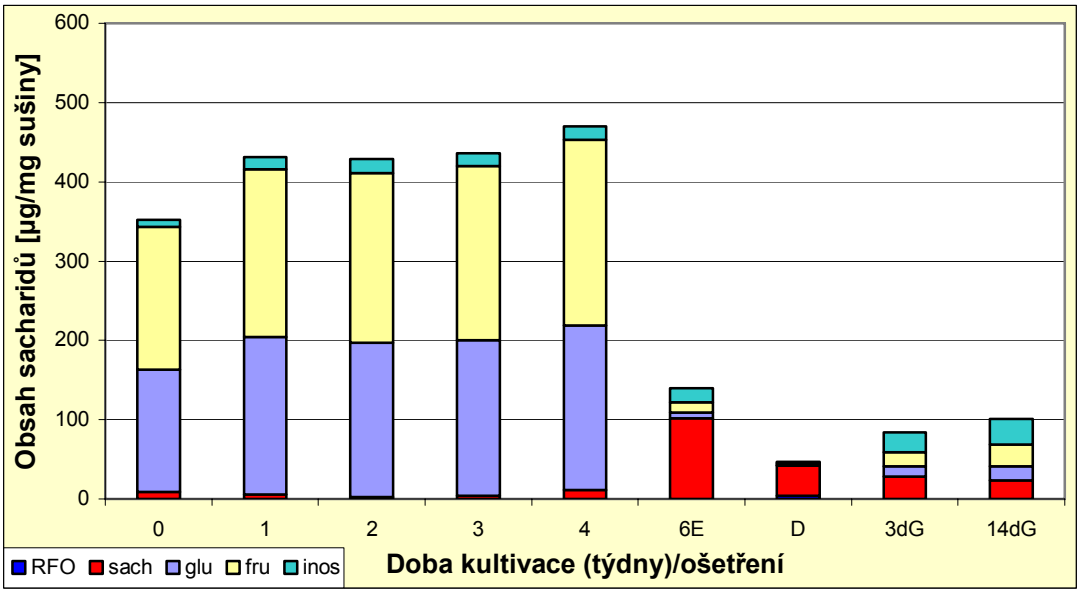
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	6,37 ± 0,85	196,38 ± 9,37	220,46 ± 15,08	19,43 ± 1,29	442,64 ± 24,76
1. týden	7,87 ± 6,10	166,74 ± 25,9	178,37 ± 29,94	21,06 ± 4,39	374,04 ± 63,46
2. týden	4,44 ± 0,48	160,38 ± 29,39	200,05 ± 33,32	19,96 ± 3,20	384,83 ± 65,08
3. týden	10,57 ± 3,15	177,33 ± 19,53	222,38 ± 19,45	22,63 ± 1,63	432,91 ± 36,42
4. týden (E)	93,26 (*)	37,75 (*)	59,3 (*)	24,51 (*)	214,82 (*)
5. týden (E)	116,02 ± 7,56	19,34 ± 2,08	30,50 ± 5,02	18,86 ± 2,66	184,72 ± 3,67
6. týden (E)	103,03 ± 12,85	13,52 ± 3,13	19,76 ± 3,98	24,24 ± 4,54	160,56 ± 21,59
desikace	9,37 ± 2,83	1,91 ± 0,45	1,06 ± 0,16	1,55 ± 0,69	13,89 ± 6,36
3 dny klíčení	3,56 ± 1,43	20,47 ± 4,85	29,65 ± 6,87	19,25 ± 4,07	72,92 ± 10,54
7 dní klíčení	10,74 ± 6,00	18,03 ± 2,09	20,56 ± 0,83	25,98 ± 4,27	75,30 ± 8,91
14 dní klíčení	15,95 ± 7,30	19,72 ± 6,92	27,09 ± 10,27	38,05 ± 7,17	100,81 ± 26,96
4ZH	15,22 ± 7,04	189,8 ± 20,04	216,63 ± 24,37	17,10 ± 5,01	438,75 ± 51,13
5ZH	2,71 ± 0,50	162,26 ± 12,89	261,36 ± 37,71	16,46 ± 4,88	442,79 ± 48,23
6ZH	2,62 ± 0,63	146,82 ± 23,01	276,67 ± 51,00	27,08 ± 6,91	453,20 ± 80,06

B



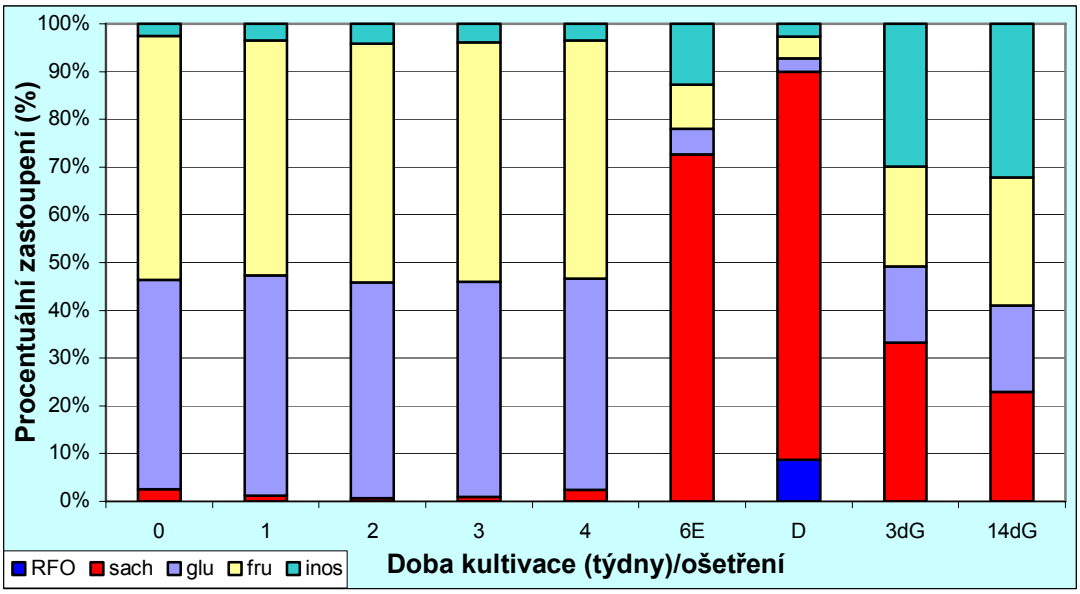
Graf 6: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta G+F</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 14dG – embrya po 3, 14 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



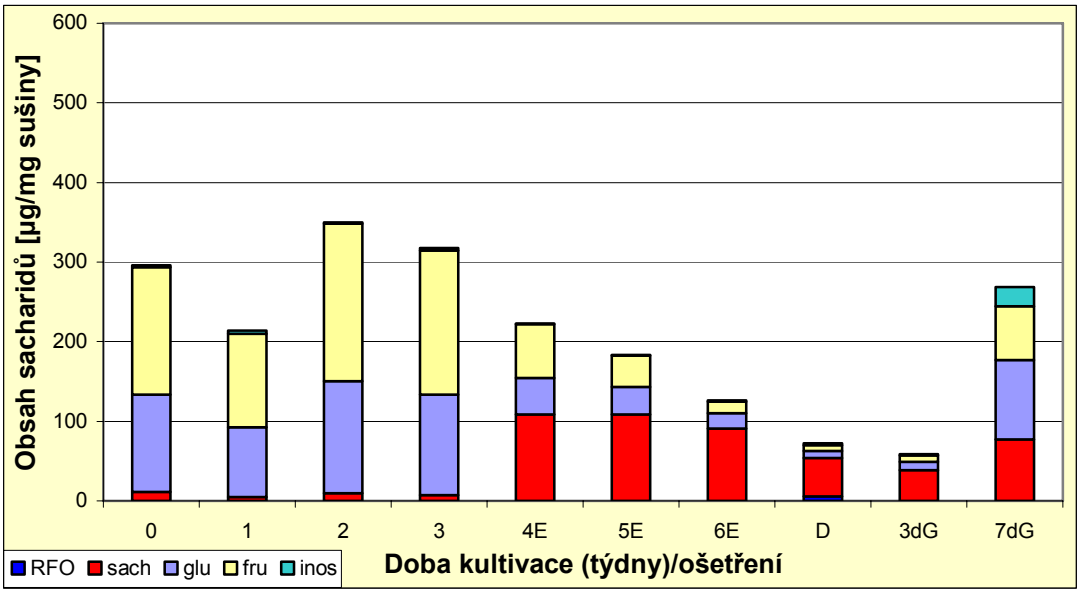
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	8,96 ± 1,85	154,34 ± 19,09	180,05 ± 22,95	8,99 ± 2,32	352,34 ± 44,45
1. týden	0	5,30 ± 2,32	198,78 ± 19,36	212,15 ± 24,24	14,94 ± 2,73	431,17 ± 43,79
2. týden	0	2,70 ± 0,88	194,10 ± 8,69	214,43 ± 10,61	17,54 ± 1,31	428,78 ± 16,98
3. týden	0	4,05 ± 1,14	196,49 ± 18,96	219,19 ± 23,79	16,74 ± 2,58	436,47 ± 44,46
4. týden	0	11,22 ± 7,14	207,60 ± 32,10	234,32 ± 34,98	16,49 ± 3,26	469,64 ± 63,74
6. týden (E)	0	101,66 ± 4,57	7,39 ± 3,00	12,96 ± 5,88	17,81 ± 2,43	139,83 ± 8,70
desikace	4,05 ± 1,99	37,75 ± 0,41	1,30 ± 0,73	2,16 ± 0,72	1,22 ± 0,04	46,48 ± 3,81
3 dny klíčení	0	27,87 ± 3,48	13,40 ± 1,67	17,49 ± 6,63	25,03 ± 1,27	83,79 ± 7,90
14 dní klíčení	0	23,18 ± 1,13	18,33 ± 3,67	27,20 ± 2,95	32,61 ± 3,30	101,31 ± 6,64

B



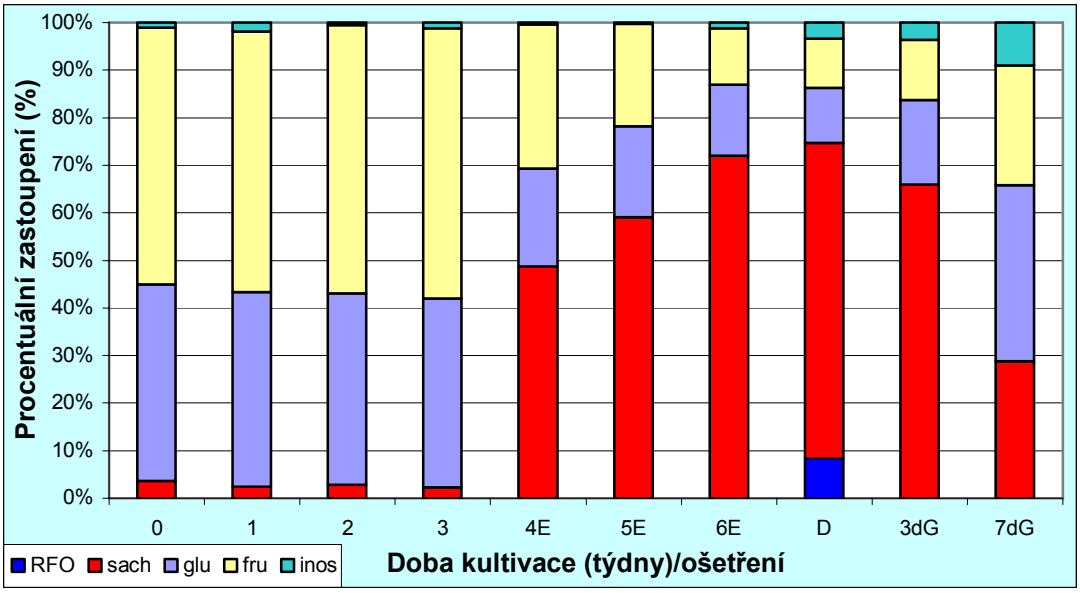
Graf 7: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, varianta S↑; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG – embrya po 3, 7 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



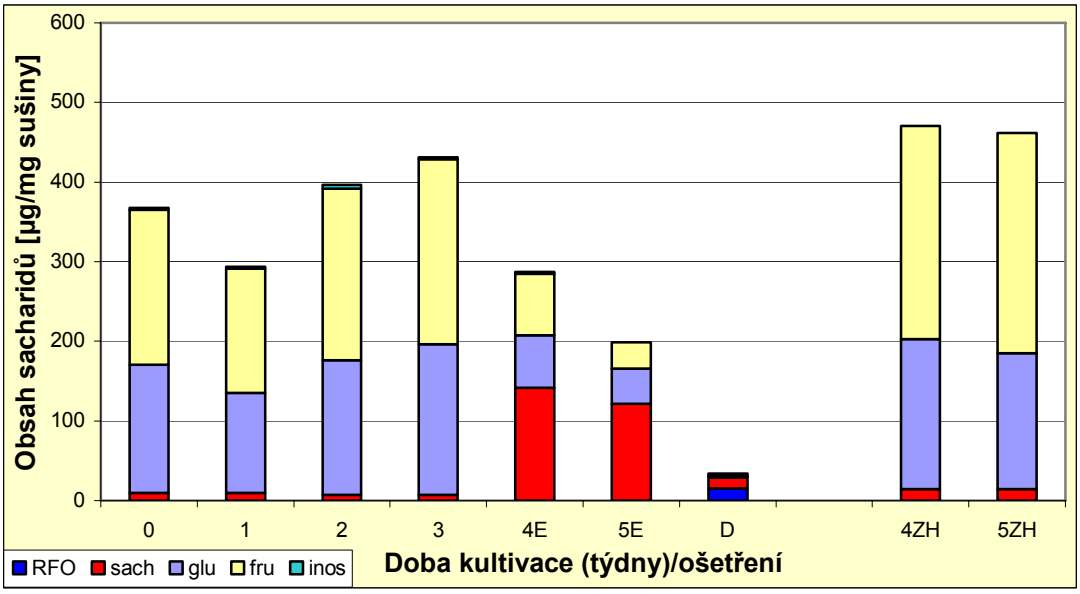
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	10,94 ± 2,53	122,17 ± 6,55	160,05 ± 9,06	3,13 ± 0,70	296,30 ± 17,43
1. týden	0	5,10 ± 0,81	87,46 ± 6,39	117,14 ± 8,71	3,95 ± 0,93	213,66 ± 15,24
2. týden	0	9,76 ± 0,88	140,74 ± 31,2	197,58 ± 32,36	1,80 ± 1,14	349,88 ± 63,42
3. týden	0	7,30 ± 1,83	126,04 ± 7,16	180,96 ± 6,38	3,69 ± 1,76	317,99 ± 10,38
4. týden (E)	0	108,39 (*)	45,96 (*)	67,45 (*)	0,88 (*)	222,68 (*)
5. týden (E)	0	108,38 ± 2,08	35,12 ± 9,32	39,36 ± 4,68	0,61 ± 0,08	183,48 ± 6,79
6. týden (E)	0	90,99 ± 8,75	18,9 ± 6,23	14,99 ± 5,30	1,45 ± 0,12	126,34 ± 19,31
desikace	6,03 ± 0,75	48,19 ± 10,81	8,39 ± 2,98	7,51 ± 1,42	2,43 ± 0,40	72,55 ± 14,87
3 dny klíčení	0	38,93 ± 2,93	10,49 ± 1,37	7,46 ± 0,58	2,13 ± 0,75	59,01 ± 4,74
7 dní klíčení	0	77,52 ± 16,26	99,46 ± 14,94	67,57 ± 10,34	24,25 ± 4,57	268,79 ± 27,90

B



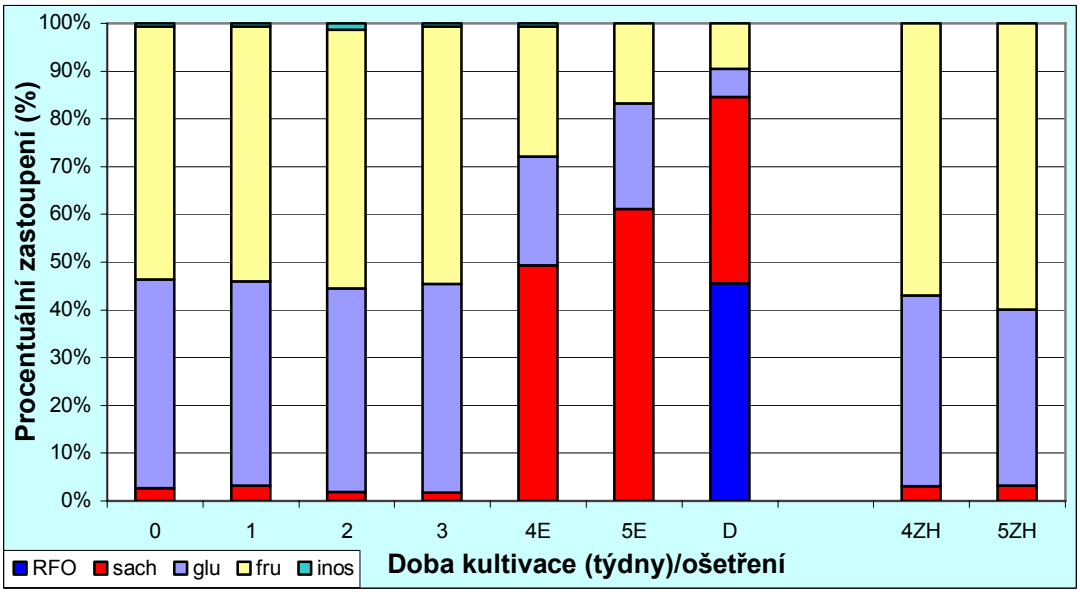
Graf 8: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta S↑</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 4ZH, 5ZH,... – 4., 5. týden zrání, zbytková hmota. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



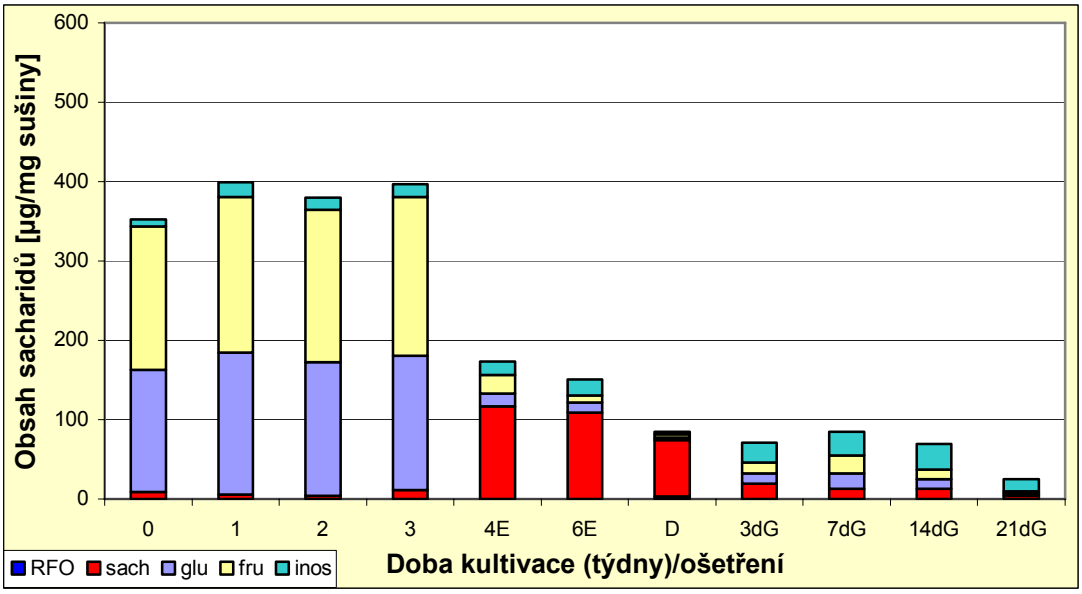
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	10,01 ± 3,07	160,73 ± 30,19	194,71 ± 42,45	2,47 ± 1,11	367,92 ± 74,45
1. týden	0	9,50 ± 1,76	125,45 ± 32,11	156,51 ± 31,59	2,03 ± 0,67	293,48 ± 63,03
2. týden	0	7,62 ± 1,42	168,91 ± 3,41	215,18 ± 4,41	5,06 ± 1,17	396,77 ± 5,31
3. týden	0	7,46 ± 2,73	188,45 ± 5,69	232,71 ± 9,36	2,81 ± 0,07	431,43 ± 14,97
4. týden (E)	0	141,75 ± 23,82	65,42 ± 1,76	77,91 ± 0,46	2,06 ± 0,08	287,15 ± 22,44
5. týden (E)	0	121,38 ± 9,25	43,96 ± 2,68	33,26 ± 3,05	0	198,59 ± 12,23
desikace	15,43 ± 3,99	13,19 ± 6,48	1,99 ± 0,93	3,21 ± 1,00	0	33,82 ± 4,60
4ZH	0	14,79 ± 4,21	188,01 ± 8,65	267,89 ± 17,75	0	470,69 ± 30,10
5ZH	0	14,60 ± 4,71	170,34 ± 20,51	276,96 ± 22,25	0	461,90 ± 45,59

B



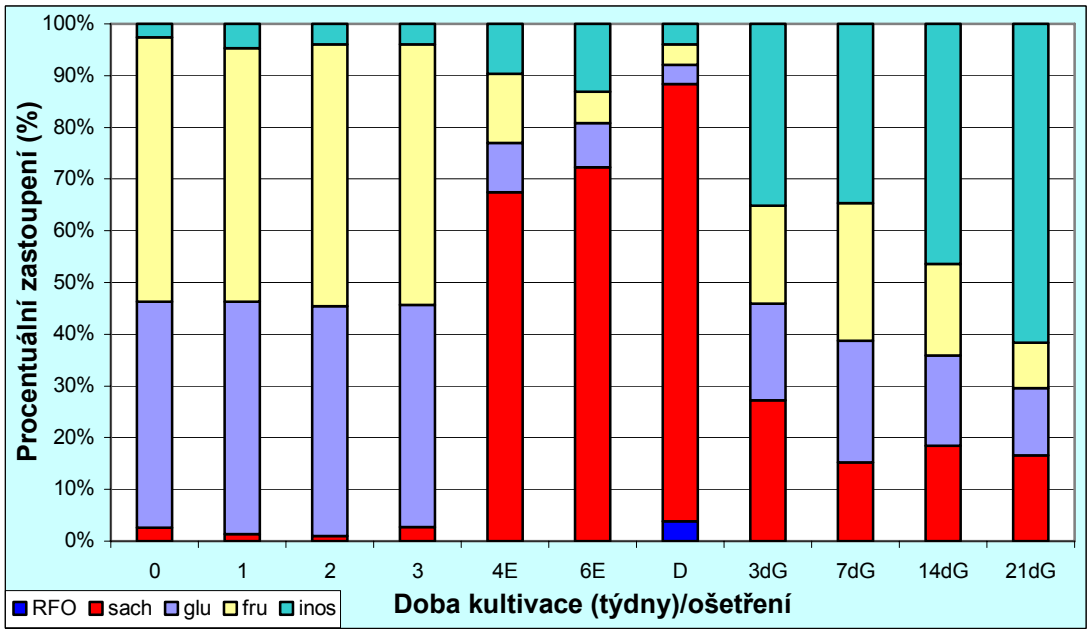
Graf 9: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta S↑</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG, 14dG, 21dG – embrya po 3, 7, 14, 21 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



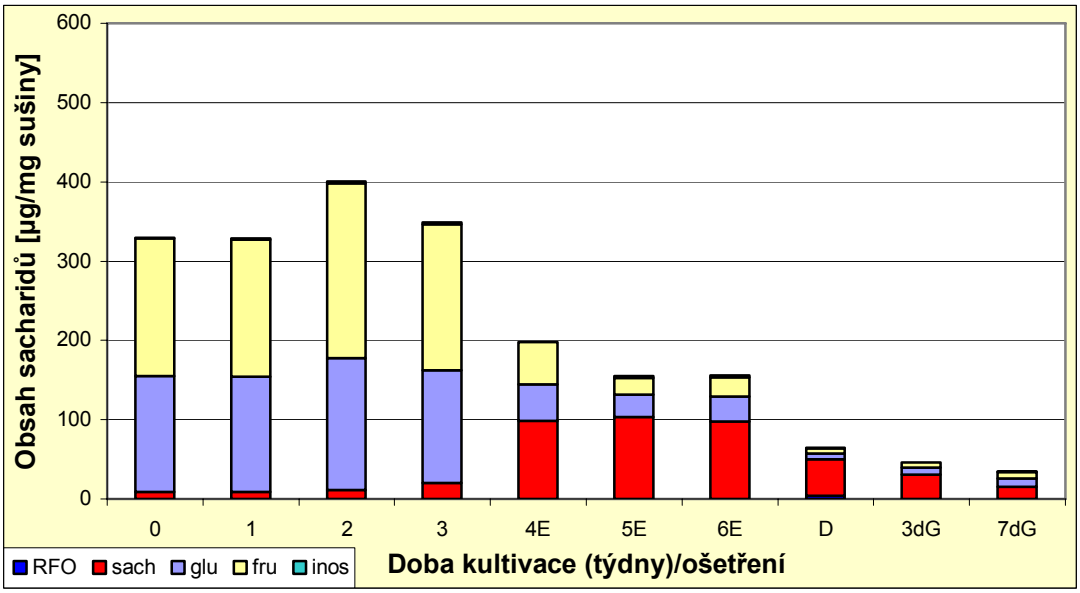
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	8,96 ± 1,85	154,34 ± 19,09	180,05 ± 22,95	8,99 ± 2,32	352,34 ± 44,45
1. týden	0	5,39 ± 2,95	179,57 ± 15,16	195,55 ± 16,25	19,01 ± 0,55	399,52 ± 29,54
2. týden	0	3,84 ± 2,10	168,64 ± 37,16	192,12 ± 49,67	15,22 ± 2,52	379,83 ± 89,40
3. týden	0	10,96 ± 3,50	170,05 ± 31,91	199,55 ± 42,89	15,92 ± 2,97	396,47 ± 79,19
4. týden (E)	0	116,86 ± 5,97	16,46 ± 11,31	23,16 ± 10,05	16,69 ± 2,72	173,16 ± 27,15
6. týden (E)	0	108,95 ± 19,24	12,88 ± 4,94	9,04 ± 4,59	19,83 ± 4,11	150,70 ± 22,29
desikace	3,26 ± 2,11	71,27 ± 21,72	3,13 ± 1,07	3,40 ± 0,99	3,31 ± 0,42	84,37 ± 23,99
3 dny klíčení	0	19,32 ± 1,60	13,22 ± 2,45	13,42 ± 1,65	24,97 ± 2,96	70,93 ± 6,79
7 dní klíčení	0	12,87 ± 2,82	19,77 ± 3,42	22,49 ± 1,38	29,21 ± 4,41	84,34 ± 1,53
14 dní klíčení	0	12,74 ± 3,34	12,09 ± 2,25	12,30 ± 1,42	32,10 ± 4,74	69,23 ± 9,33
21 dní klíčení	0	4,11 ± 1,36	3,24 ± 0,46	2,17 ± 0,50	15,33 ± 4,54	24,86 ± 5,98

B



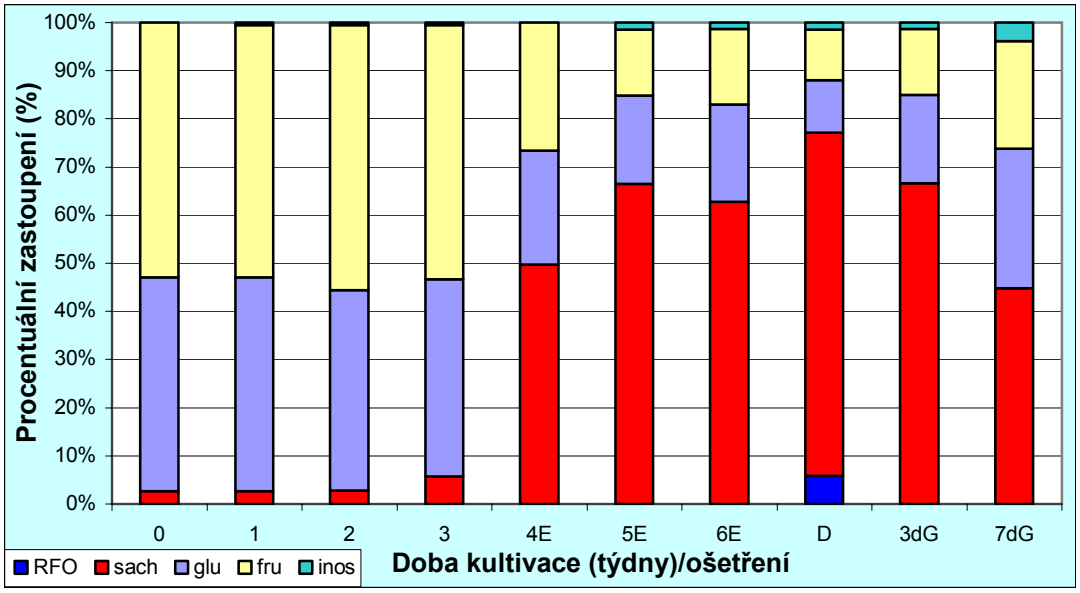
Graf 10: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, varianta G+F↑; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG – embrya po 3, 7 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



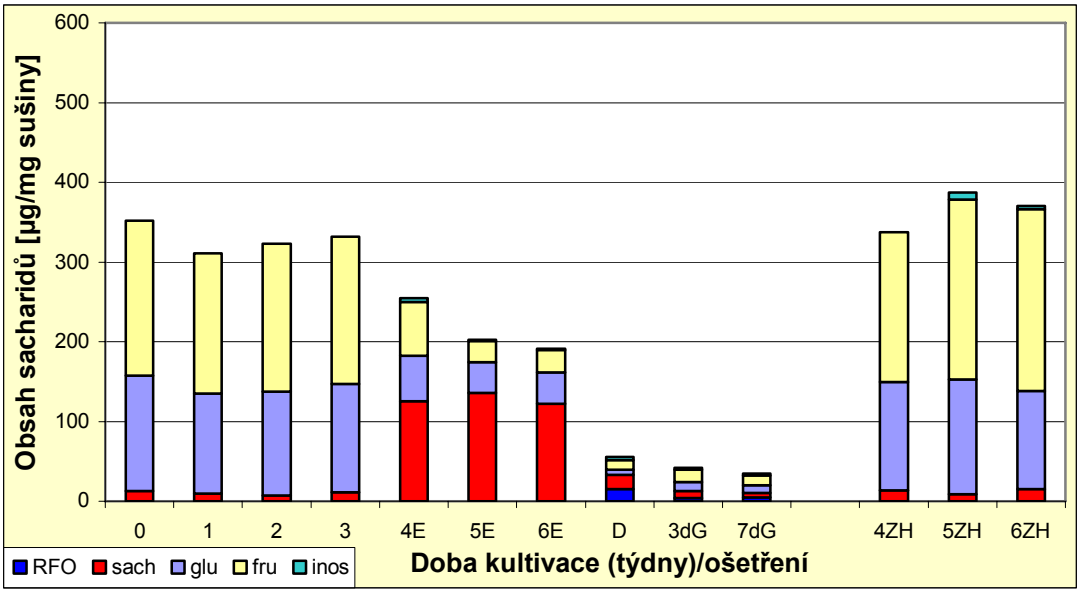
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0 .týden	0	8,74 ± 2,79	146,36 ± 4,49	173,8 ± 5,08	0,18 ± 0,06	329,08 ± 10,3
1. týden	0	8,88 ± 2,26	145,70 ± 4,18	172,4 ± 4,25	1,70 ± 0,94	328,68 ± 7,05
2. týden	0	11,34 ± 1,74	166,33 ± 43,65	220,46 ± 58,31	2,04 ± 0,95	400,17 ± 102,65
3. týden	0	19,88 ± 3,92	142,82 ± 18,83	183,85 ± 22,75	1,97 ± 1,01	348,53 ± 38,12
4. týden (E)	0	98,17 (*)	46,71 (*)	52,65 (*)	0	197,53 (*)
5. týden (E)	0	103,06 ± 11,65	28,35 ± 6,55	21,24 ± 4,22	2,35 ± 0,66	155 ± 23,48
6. týden (E)	0	97,56 ± 5,50	31,38 ± 4,73	24,46 ± 4,25	2,06 ± 0,26	155,47 ± 8,74
desikace	3,75 ± 1,92	46,15 ± 17,66	7,09 ± 1,91	6,83 ± 0,45	0,93 ± 0,30	64,74 ± 22,02
3 dny klíčení	0	30,82 ± 3,01	8,51 ± 0,73	6,30 ± 0,55	0,63 ± 0,46	46,26 ± 2,86
7 dní klíčení	0	15,67 ± 2,98	10,09 ± 2,59	7,83 ± 0,49	1,34 ± 0,37	34,93 ± 5,05

B



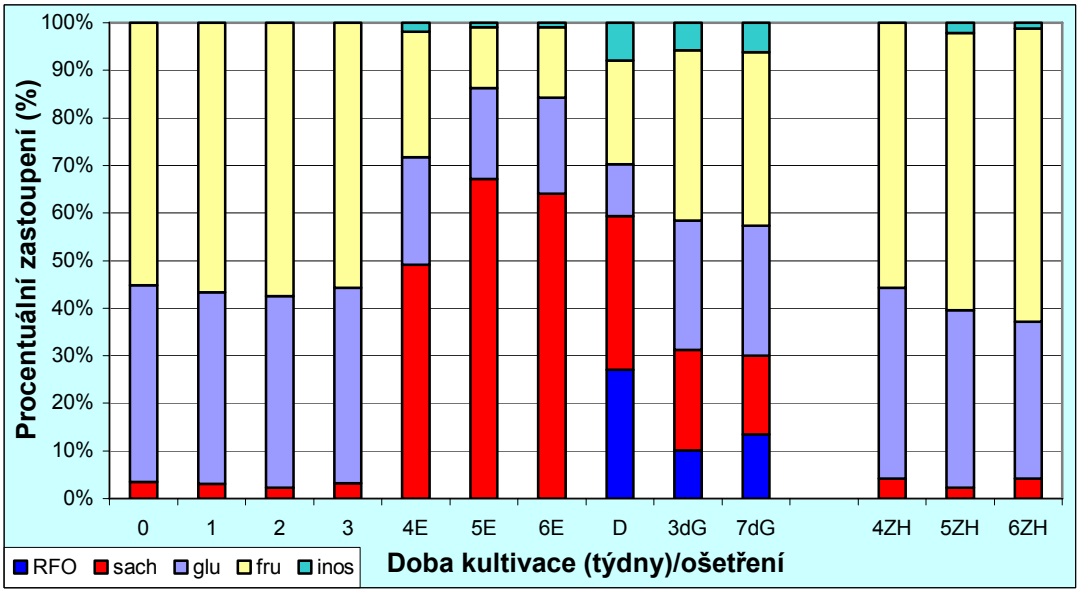
Graf 11: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, <u>varianta G+F↑</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG – embrya po 3, 7 dnech klíčení; 4ZH, 5ZH,... – 4., 5. týden zrání, zbytková hmota. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



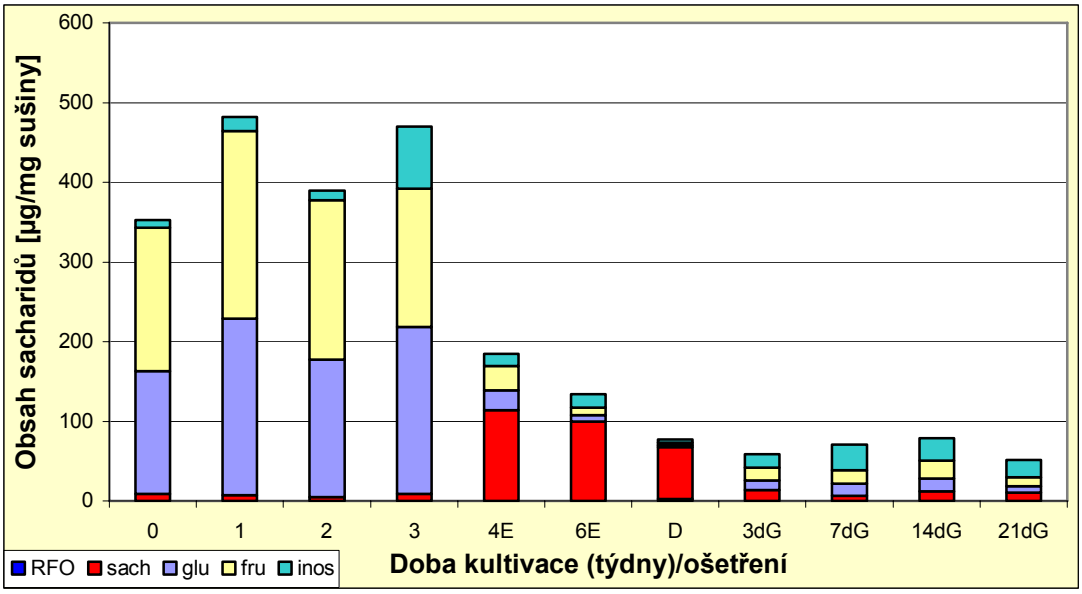
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	12,54 ± 1,46	145,16 ± 6,48	194,03 ± 6,09	0	351,72 ± 11,94
1. týden	0	9,59 ± 2,38	125,06 ± 26,22	176,03 ± 34,40	0	310,67 ± 62,39
2. týden	0	7,47 ± 1,48	129,54 ± 16,84	185,52 ± 22,39	0	322,53 ± 40,45
3. týden	0	10,93 ± 3,77	136,15 ± 40,12	184,69 ± 47,52	0	331,76 ± 90,58
4. týden (E)	0	125,34 ± 1,88	57,35 ± 9,24	67,34 ± 11,89	4,85 ± 1,80	254,87 ± 21,20
5. týden (E)	0	135,80 ± 16,32	38,71 ± 5,54	25,91 ± 3,88	1,92 ± 0,06	202,34 ± 25,56
6. týden (E)	0	122,40 ± 39,03	38,74 ± 10,90	28,23 ± 6,56	1,87 ± 0,17	191,24 ± 56,37
desikace	14,99 ± 3,59	17,95 ± 3,90	6,04 ± 1,87	12,08 ± 3,02	4,43 ± 0,77	55,49 ± 11,87
3 dny klíčení	4,24 ± 0,80	8,85 ± 0,92	11,34 ± 1,70	15,02 ± 2,46	2,42 ± 0,34	41,87 ± 4,63
7 dní klíčení	4,64 ± 0,28	5,69 ± 2,57	9,43 ± 2,27	12,56 ± 0,24	2,15 ± 0,94	34,46 ± 3,05
4ZH	0	13,91 ± 7,30	135,48 ± 24,15	187,98 ± 31,83	0	337,37 ± 60,64
5ZH	0	8,73 ± 0,83	144,07 ± 17,17	225,67 ± 26,29	8,30 ± 0,39	386,77 ± 45,64
6ZH	0	15,64 ± 2,55	122,16 ± 5,42	228,21 ± 6,00	4,46 ± 0,42	370,48 ± 8,56

B



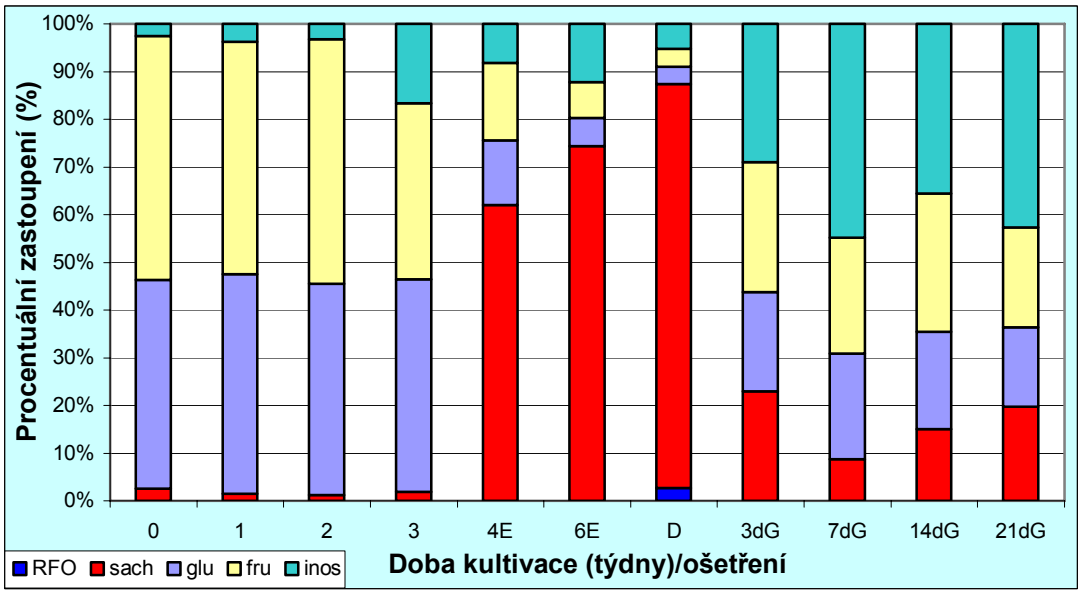
Graf 12: Obsah endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích a ESM *Picea abies*, varianta G+F↑ (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – ESM po proliferaci; 1, 2, 3... – 1., 2., 3. týden zrání; 4E, 5E, 6E – izolovaná embrya; D – embrya po desikaci; 3dG, 7dG, 14dG, 21dG – embrya po 3, 7, 14, 21 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					
	RFO	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	8,96 ± 1,85	154,34 ± 19,09	180,05 ± 22,95	8,99 ± 2,32	352,34 ± 44,45
1. t ýden	0	6,85 ± 3,13	222,15 ± 23,98	235,25 ± 35,04	17,85 ± 9,23	482,09 ± 68,21
2. t ýden	0	4,49 ± 2,01	172,85 ± 51,60	200,11 ± 64,38	12,35 ± 3,88	389,81 ± 118,62
3. týden	0	8,84 ± 2,42	209,43 ± 21,02	173,51 ± 101,76	78,43 ± 124,10	470,20 ± 46,38
4. týden (E)	0	114,37 ± 8,71	24,92 ± 19,86	29,99 ± 32,34	15,12 ± 1,48	184,40 ± 45,24
6. týden (E)	0	99,41 ± 12,14	8,04 ± 1,34	10,04 ± 3,12	16,30 ± 1,81	133,80 ± 16,23
desikace	2,09 ± 0,54	65,23 ± 5,24	2,77 ± 0,98	2,90 ± 0,54	4,00 ± 0,75	76,99 ± 5,10
3 dny klíčení	0	13,54 ± 10,32	12,26 ± 2,21	16,14 ± 2,73	17,10 ± 2,42	59,04 ± 10,10
7 dní klíčení	0	6,19 ± 1,84	15,53 ± 2,97	17,15 ± 3,98	31,59 ± 8,79	70,46 ± 14,06
14 dní klíčení	0	11,88 ± 4,05	16,10 ± 1,64	22,91 ± 2,22	28,11 ± 3,92	79,00 ± 3,38
21 dní klíčení	0	10,08 ± 3,06	8,55 ± 2,42	10,73 ± 1,84	21,88 ± 6,64	51,23 ± 6,55

B



4.1.2. Analýza tekutých maturačních médií během zrání somatických embryí

Tekuté médium (1 ml) jsem odebírala u všech experimentálních variant vždy na konci subkultivačního intervalu.

Varianta S

Celkový obsah sacharidů v tekutém médiu na konci týdenních subkultivačních intervalů v průběhu šesti týdnů zrání byl přibližně 25 µg/ml média a ke konci zrání mírně klesal. Přesto, že na začátku subkultivačního intervalu obsahovalo čerstvé médium sacharózu, po týdnu kultivace byly v médiu přítomny především hexózy, glukóza a fruktóza. V prvních třech týdnech zrání byly glukóza a fruktóza rovnoměrně zastoupeny, v posledních třech týdnech se poměr mírně změnil ve prospěch fruktózy. Sacharóza tvořila jen minimální část spektra obsažených sacharidů.

Varianta G+F

Celkový obsah sacharidů v tekutém médiu na konci týdenních subkultivačních intervalů v průběhu šesti týdnů zrání byl i u této varianty přibližně 25 µg/ml média. Spektrum sacharidů bylo tvořeno glukózou a fruktózou, které byly v prvních třech týdnech zastoupeny rovnoměrně a v posledních třech týdnech se poměr mírně změnil ve prospěch fruktózy. Sacharóza nebyla v maturačním médiu přítomna.

Varianta S↑

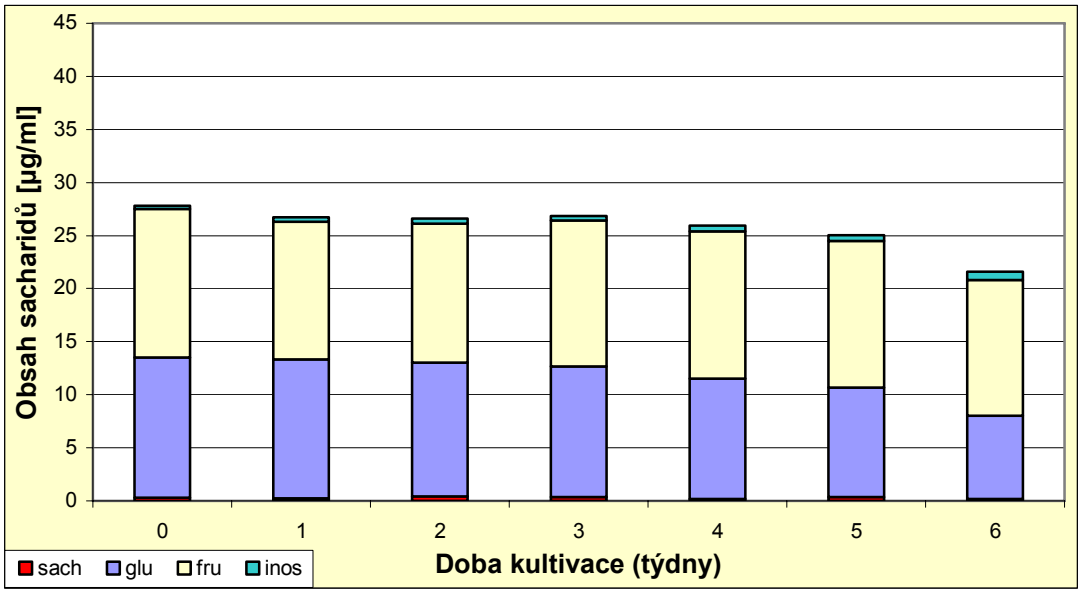
Celkové obsahy sacharidů v tekutém médiu na konci subkultivačních intervalů (v každém týdnu zrání byl subkultivační interval 2 dny, 2 dny, 3 dny) byly u této varianty přibližně 30 µg/ml média. Spektrum sacharidů bylo tvořeno na konci každého subkultivačního intervalu především glukózou a fruktózou a v menším zastoupení sacharózou. Zkrácením subkultivačního intervalu na 2 a 3 dny se podařilo omezit degradaci sacharózy v médiu. Po třídenním subkultivačním intervalu bylo zastoupení sacharózy ve spektru sacharidů zpravidla nižší, než po dvoudenním sukultivačním intervalu.

Varianta G+F↑

Celkové obsahy sacharidů v tekutém médiu na konci subkultivačních intervalů (v každém týdnu zrání byl subkultivační interval 2 dny, 2 dny, 3 dny) byly u této varianty přibližně 30 µg/ml média. Během týdne zrání byla kultura přesazována na média se snižující se koncentrací sacharózy, což se projevilo i na snižujícím se zastoupení sacharózy v médiu po kultivaci s embryogenní kulturou.

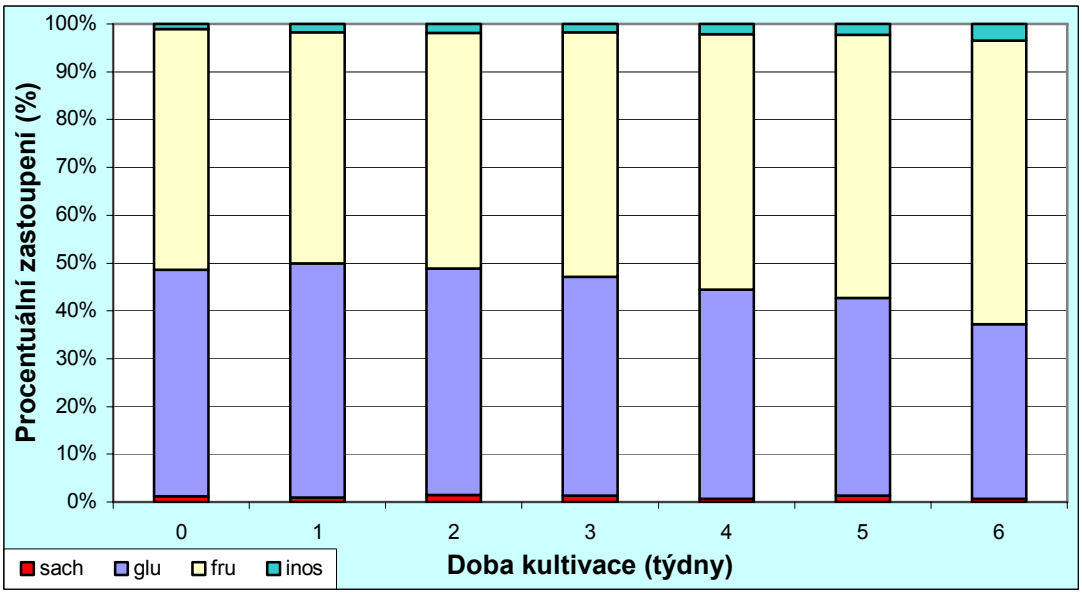
Graf 13: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, varianta S; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



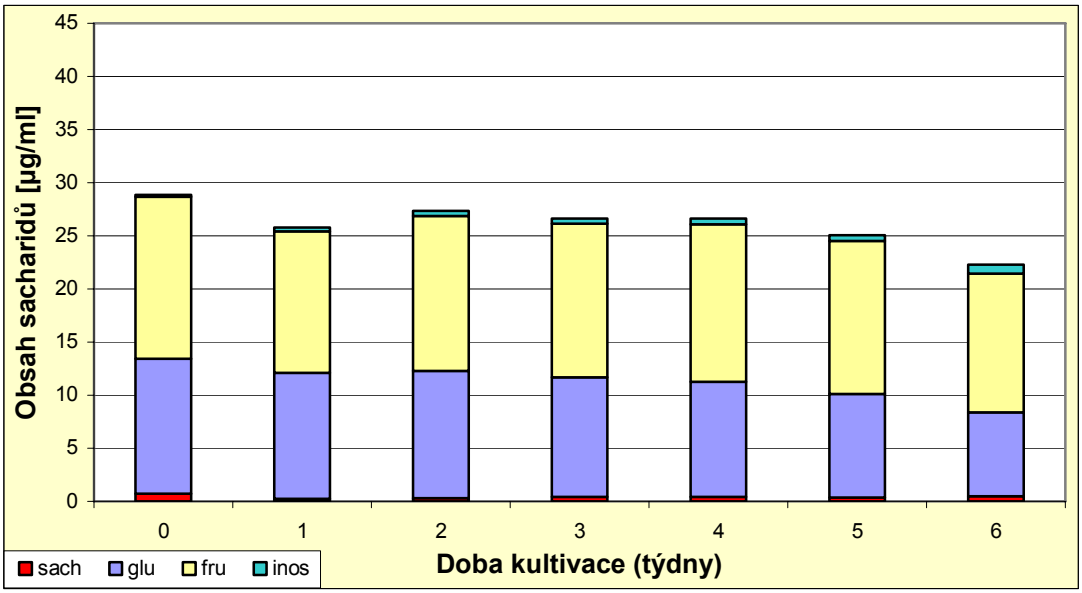
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0,32 ± 0,04	13,20 ± 0,60	14,01 ± 0,69	0,30 ± 0,03	27,82 ± 1,33
1. týden	0,26 ± 0,11	13,09 ± 0,53	12,92 ± 0,73	0,45 ± 0,05	26,73 ± 1,20
2. týden	0,41 ± 0,11	12,59 ± 0,28	13,09 ± 0,22	0,49 ± 0,13	26,58 ± 0,39
3. týden	0,34 ± 0,06	12,30 ± 0,19	13,75 ± 0,28	0,45 ± 0,09	26,85 ± 0,37
4. týden	0,16 ± 0,00	11,38 ± 0,32	13,85 ± 0,29	0,57 ± 0,08	25,96 ± 0,68
5. týden	0,34 ± 0,18	10,35 ± 0,48	13,81 ± 0,49	0,55 ± 0,12	25,06 ± 0,87
6. týden	0,15 ± 0,03	7,89 ± 0,33	12,79 ± 0,30	0,74 ± 0,12	21,58 ± 0,53

B



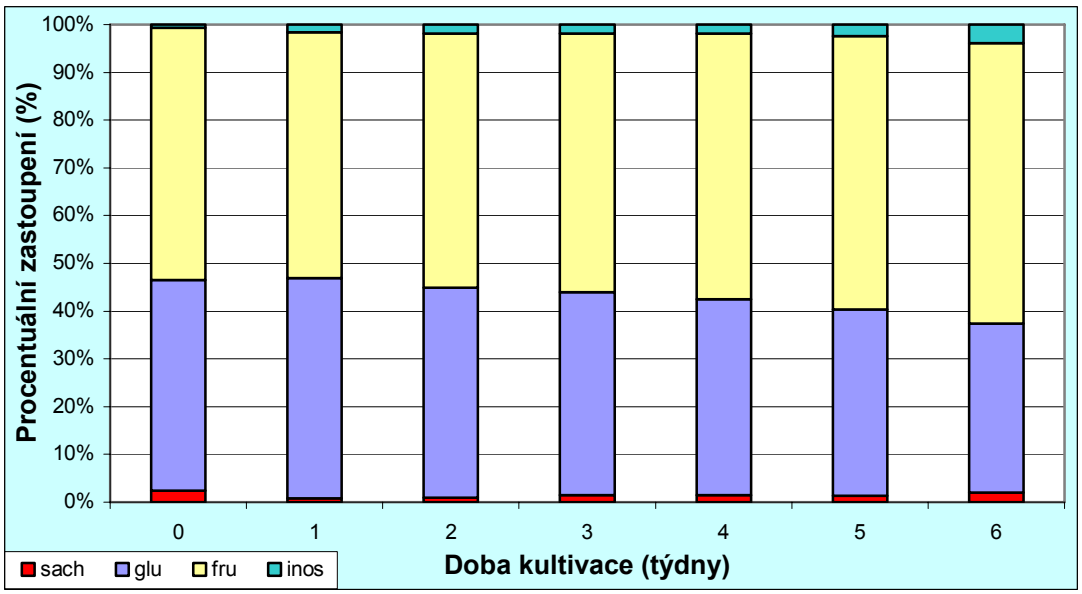
Graf 14: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



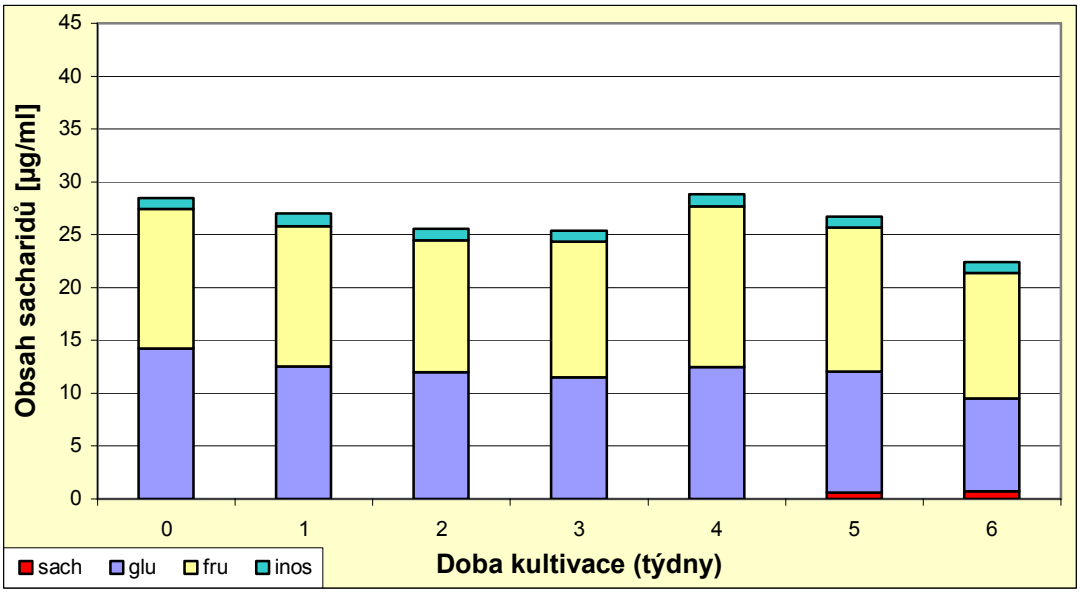
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0,71 ± 0,38	12,72 ± 0,34	15,23 ± 0,47	0,18 ± 0,02	28,85 ± 0,56
1. týden	0,22 ± 0,03	11,88 ± 0,13	13,31 ± 0,19	0,40 ± 0,09	25,81 ± 0,31
2. týden	0,27 ± 0,08	12,01 ± 0,44	14,58 ± 0,62	0,52 ± 0,06	27,38 ± 1,07
3. týden	0,41 ± 0,17	11,30 ± 0,97	14,44 ± 1,02	0,51 ± 0,03	26,66 ± 2,03
4. týden	0,41 ± 0,24	10,89 ± 0,64	14,81 ± 0,81	0,49 ± 0,06	26,60 ± 1,67
5. týden	0,35 ± 0,16	9,78 ± 0,35	14,37 ± 0,35	0,59 ± 0,06	25,08 ± 0,80
6. týden	0,46 ± 0,17	7,89 ± 0,31	13,07 ± 0,31	0,87 ± 0,06	22,30 ± 0,40

B



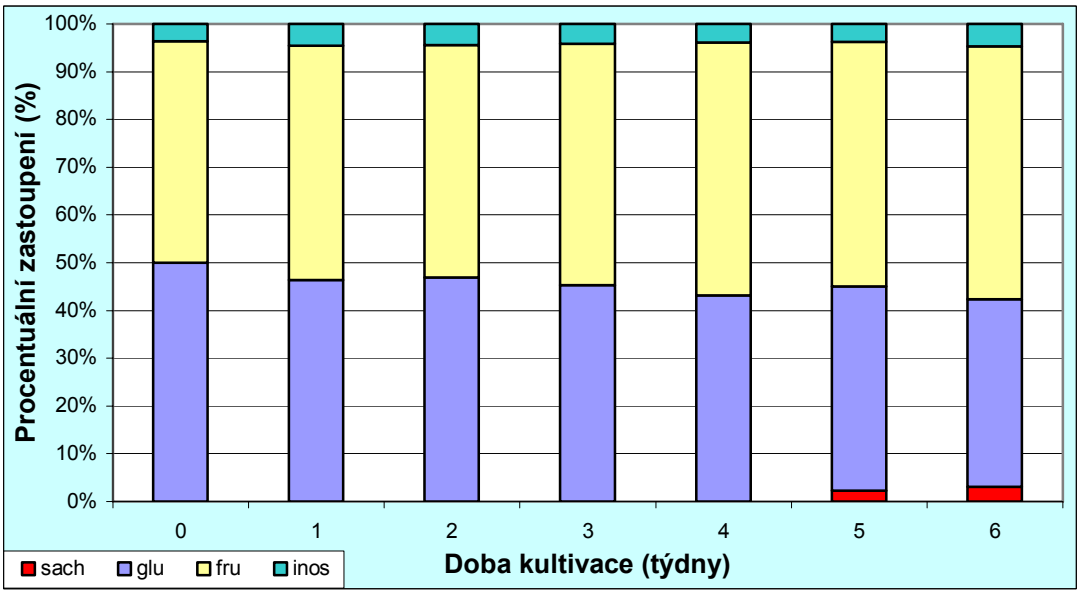
Graf 15: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



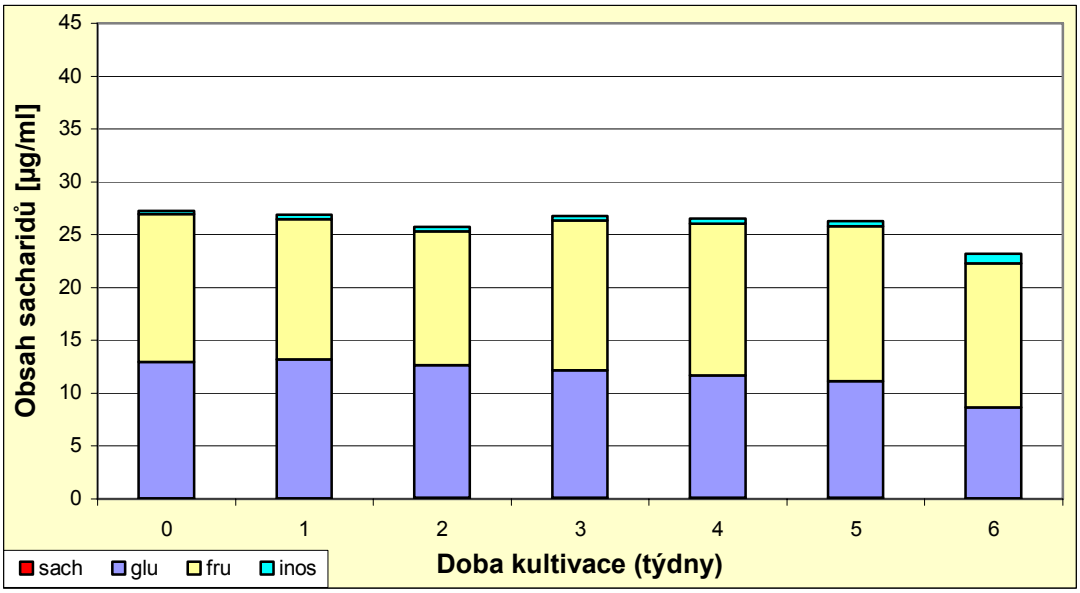
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0	14,25 ± 0,26	13,21 ± 0,29	1,02 ± 0,05	28,47 ± 0,42
1. týden	0	12,53 ± 0,41	13,26 ± 0,75	1,23 ± 0,15	27,02 ± 1,02
2. týden	0	12,01 ± 0,33	12,43 ± 0,22	1,14 ± 0,23	25,59 ± 0,60
3. týden	0	11,51 ± 0,14	12,81 ± 1,35	1,06 ± 0,09	25,38 ± 1,40
4. týden	0	12,45 ± 0,35	15,22 ± 0,92	1,13 ± 0,09	28,81 ± 1,20
5. týden	0,61 ± 0,19	11,42 ± 0,39	13,67 ± 0,40	1,01 ± 0,06	26,71 ± 0,34
6. týden	0,70 ± 0,40	8,08 ± 0,75	11,86 ± 0,72	1,06 ± 0,05	22,42 ± 1,21

B



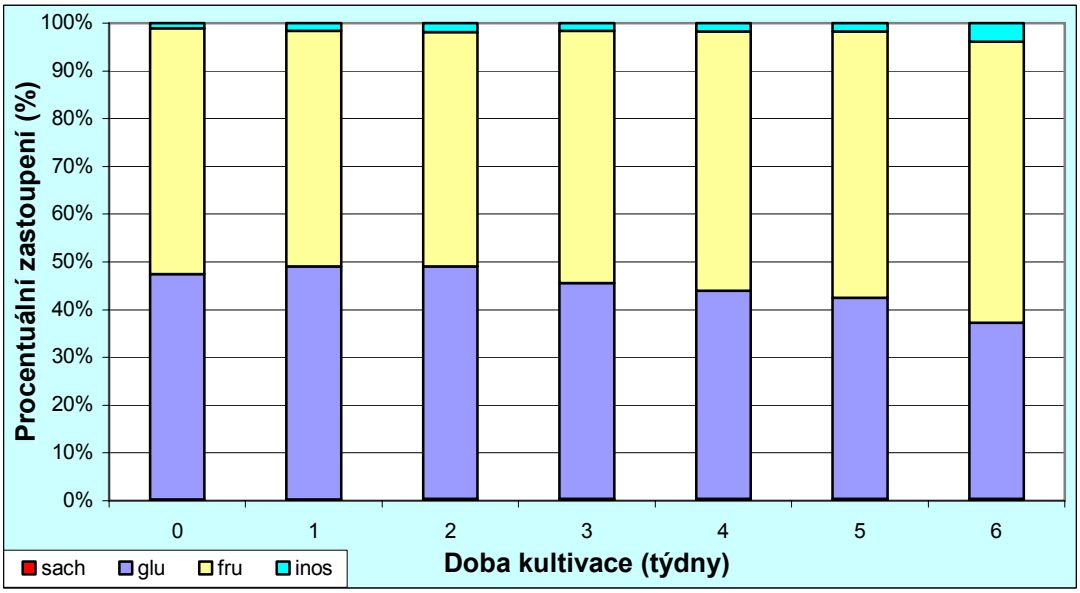
Graf 16: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F</u>; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



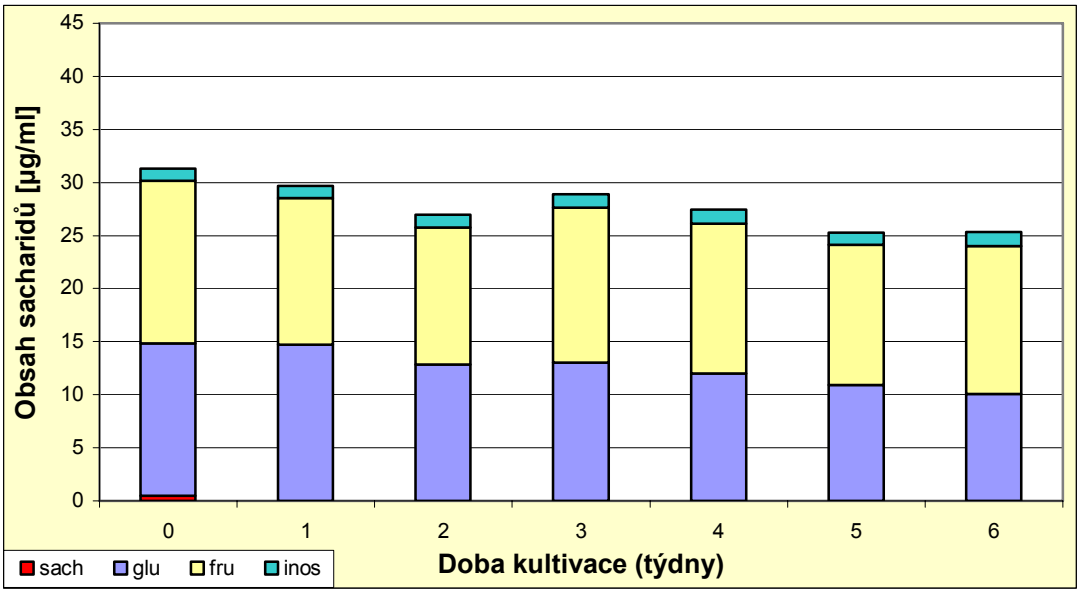
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0,07 ± 0,01	12,87 ± 0,18	14,02 ± 0,25	0,30 ± 0,03	27,26 ± 0,41
1. týden	0,08 ± 0,01	13,11 ± 0,12	13,26 ± 0,41	0,42 ± 0,08	26,86 ± 0,48
2. týden	0,09 ± 0,02	12,55 ± 0,15	12,65 ± 0,99	0,47 ± 0,01	25,76 ± 0,84
3. týden	0,10 ± 0,02	12,10 ± 0,55	14,16 ± 0,46	0,43 ± 0,10	26,79 ± 0,87
4. týden	0,11 ± 0,02	11,55 ± 0,23	14,36 ± 0,04	0,47 ± 0,07	26,50 ± 0,20
5. týden	0,11 ± 0,01	11,05 ± 0,52	14,66 ± 0,23	0,47 ± 0,09	26,29 ± 0,70
6. týden	0,09 ± 0,02	8,56 ± 0,92	13,66 ± 0,58	0,89 ± 0,25	23,20 ± 1,29

B



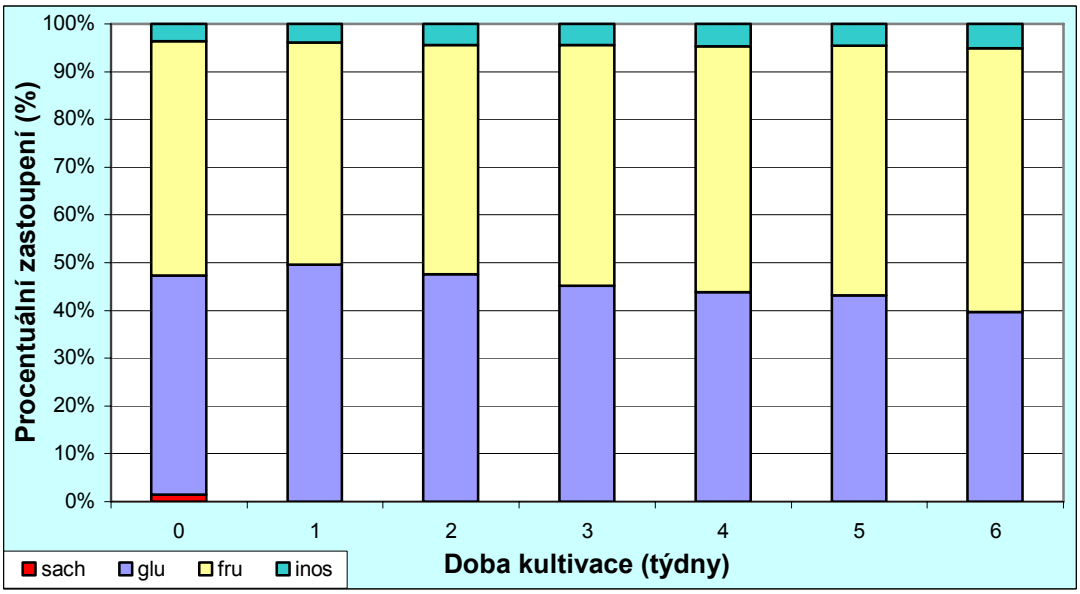
Graf 17: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



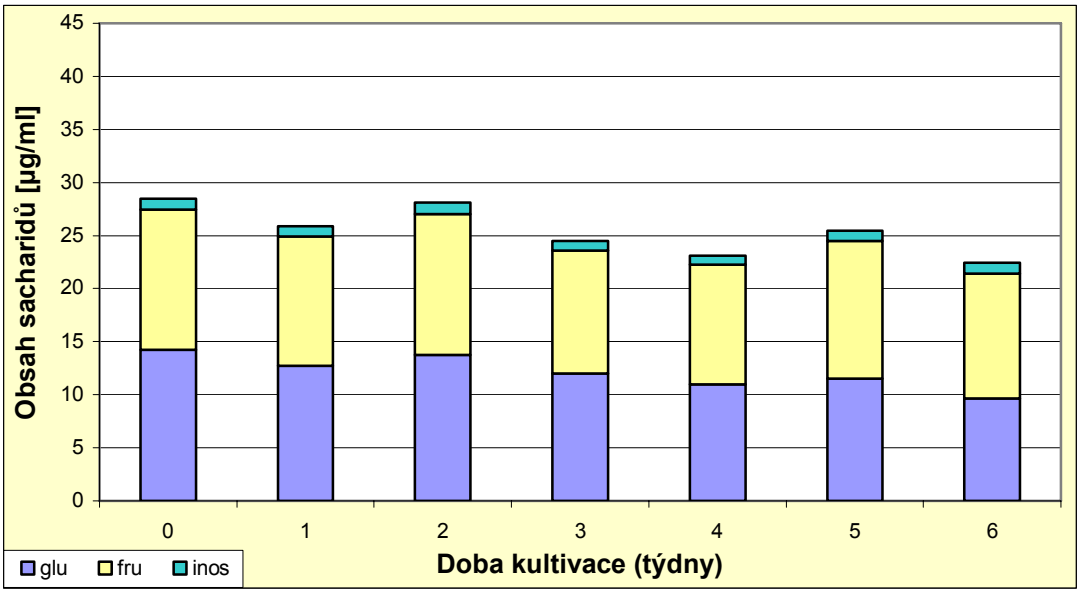
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]				
	sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	0,48 ± 0,09	14,34 ± 0,49	15,37 ± 0,44	1,12 ± 0,08	31,31 ± 1,05
1. týden	0	14,72 ± 0,75	13,79 ± 0,62	1,16 ± 0,12	29,67 ± 1,44
2. týden	0	12,84 ± 1,37	12,93 ± 1,44	1,19 ± 0,34	26,96 ± 3,05
3. týden	0	13,05 ± 0,44	14,60 ± 0,12	1,27 ± 0,12	28,92 ± 0,43
4. týden	0	12,01 ± 0,78	14,12 ± 0,81	1,31 ± 0,13	27,44 ± 1,68
5. týden	0	10,93 ± 1,11	13,20 ± 1,41	1,15 ± 0,18	25,29 ± 2,70
6. týden	0	10,07 ± 1,41	13,96 ± 1,34	1,30 ± 0,15	25,33 ± 2,89

B



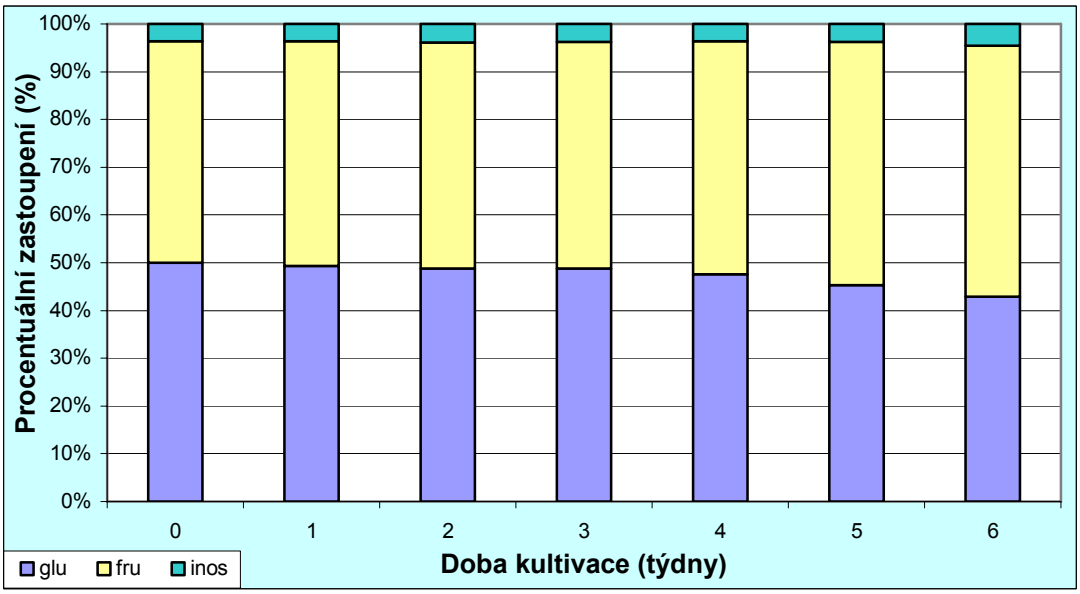
Graf 18: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 1, 2, 3... – maturační médium 1., 2., 3. týden zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



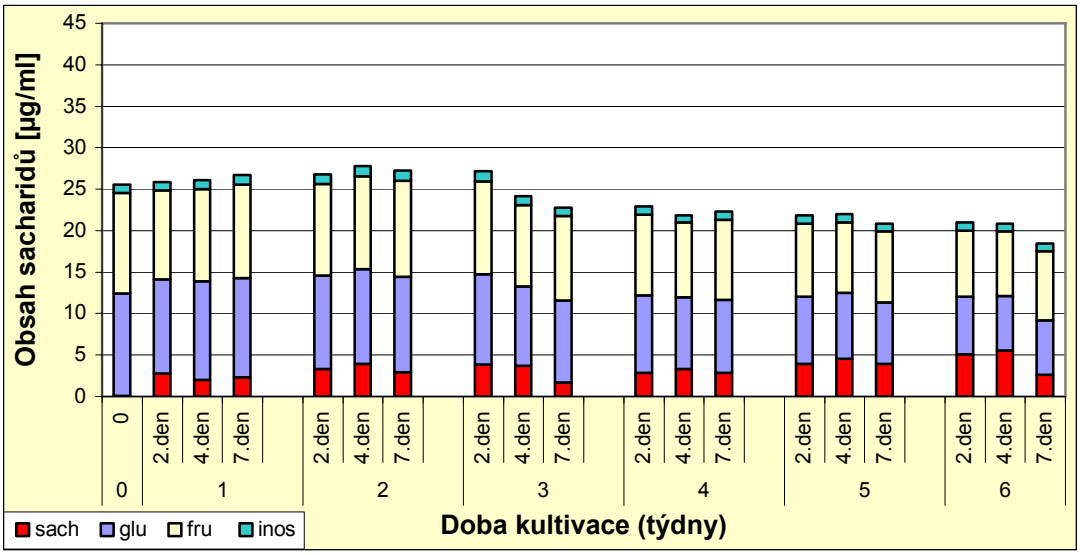
Doba kultivace	Obsah sacharidů [µg/ml]			
	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden	14,25 ± 0,26	13,21 ± 0,29	1,02 ± 0,05	28,47 ± 0,42
1. týden	12,74 ± 2,14	12,16 ± 1,69	0,94 ± 0,14	25,85 ± 3,95
2. týden	13,73 ± 0,34	13,30 ± 0,52	1,11 ± 0,11	28,13 ± 0,78
3. týden	11,97 ± 0,99	11,63 ± 0,93	0,91 ± 0,11	24,51 ± 2,02
4. týden	10,99 ± 1,35	11,25 ± 1,44	0,85 ± 0,13	23,09 ± 2,84
5. týden	11,54 ± 0,79	12,93 ± 0,22	0,96 ± 0,09	25,43 ± 1,02
6. týden	9,63 ± 0,61	11,80 ± 0,73	1,03 ± 0,12	22,46 ± 1,39

B



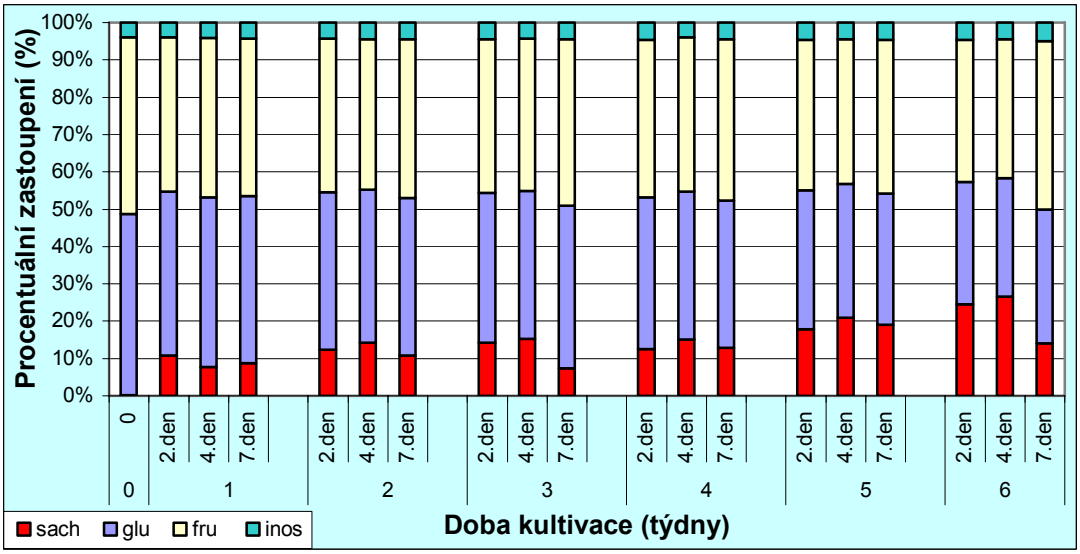
Graf 19: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u>; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



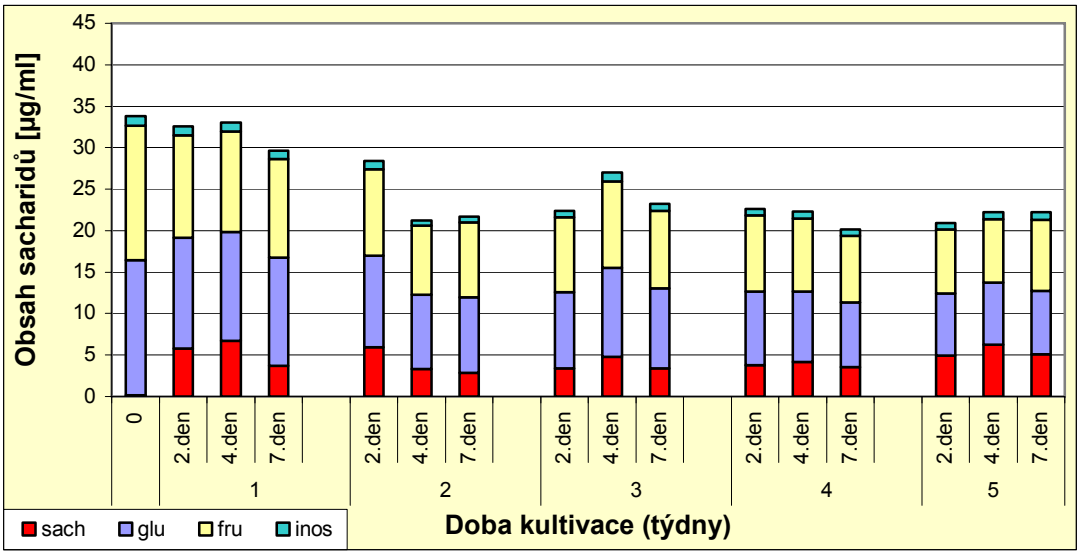
Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0,05 ± 0,05	12,40 ± 0,10	12,07 ± 0,31	1,02 ± 0,21	25,55 ± 0,48
1. týden	**2. den**	2,81 ± 0,93	11,33 ± 0,25	10,70 ± 0,38	1,04 ± 0,02	25,89 ± 0,42
	4. den	2,01 ± 0,28	11,88 ± 0,19	11,12 ± 0,15	1,07 ± 0,10	26,08 ± 0,42
	7. den	2,35 ± 0,14	11,92 ± 0,28	11,25 ± 0,23	1,17 ± 0,07	26,68 ± 0,63
2. týden	**2. den**	3,33 ± 0,51	11,29 ± 0,49	11,02 ± 0,46	1,15 ± 0,06	26,79 ± 0,59
	4. den	3,96 ± 0,58	11,38 ± 1,66	11,21 ± 1,51	1,24 ± 0,15	27,79 ± 3,08
	7. den	2,93 ± 0,59	11,50 ± 0,67	11,60 ± 0,93	1,22 ± 0,10	27,24 ± 1,41
3. týden	**2. den**	3,85 ± 0,60	10,90 ± 0,70	11,18 ± 0,86	1,21 ± 0,12	27,15 ± 1,27
	4. den	3,70 ± 0,68	9,55 ± 0,68	9,85 ± 0,80	1,04 ± 0,14	24,14 ± 1,94
	7. den	1,69 ± 0,21	9,88 ± 0,39	10,17 ± 0,40	1,01 ± 0,03	22,74 ± 0,80
4. týden	**2. den**	2,86 ± 0,96	9,33 ± 0,37	9,72 ± 0,49	1,05 ± 0,11	22,96 ± 0,73
	4. den	3,30 ± 0,53	8,68 ± 0,63	9,04 ± 0,67	0,85 ± 0,32	21,88 ± 1,41
	7. den	2,88 ± 0,58	8,81 ± 0,26	9,62 ± 0,26	1,01 ± 0,08	22,32 ± 0,72
5. týden	**2. den**	3,90 ± 0,28	8,11 ± 0,32	8,83 ± 0,33	1,00 ± 0,11	21,85 ± 0,36
	4. den	4,59 ± 0,58	7,88 ± 0,46	8,55 ± 0,41	0,97 ± 0,05	21,99 ± 0,60
	7. den	3,97 ± 0,33	7,35 ± 0,23	8,57 ± 0,16	0,98 ± 0,03	20,87 ± 0,38
6. týden	**2. den**	5,13 ± 0,45	6,88 ± 0,39	8,00 ± 0,40	0,96 ± 0,04	20,96 ± 0,91
	4. den	5,54 ± 1,27	6,59 ± 0,32	7,75 ± 0,16	0,94 ± 0,02	20,82 ± 1,46
	7. den	2,61 ± 1,27	6,61 ± 0,32	8,33 ± 0,16	0,92 ± 0,02	18,47 ± 1,46

B



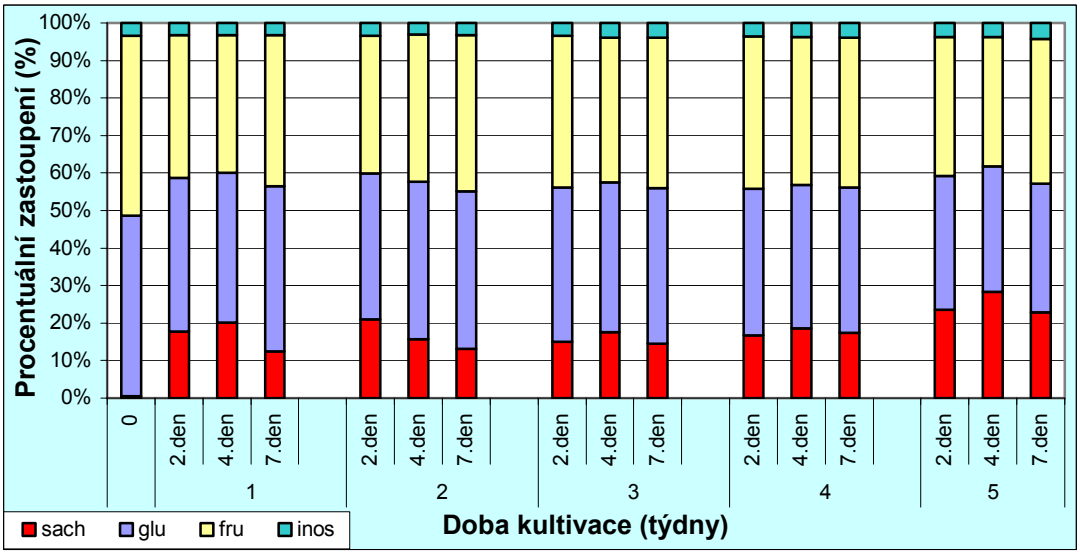
Graf 20: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



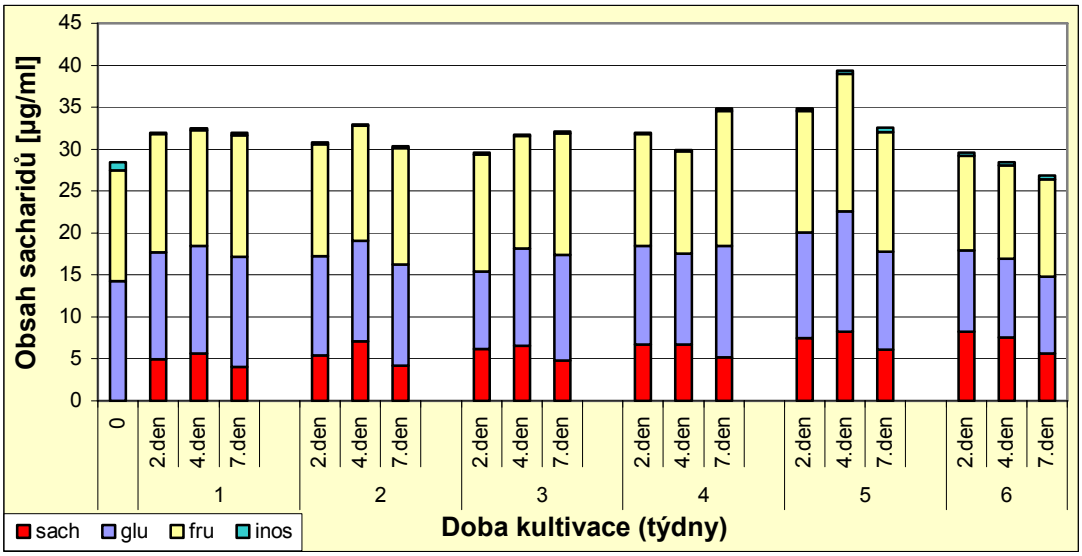
Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0,19 ± 0,13	16,23 ± 0,50	16,24 ± 0,67	1,14 ± 0,11	33,80 ± 1,11
1. týden	**2. den**	5,78 ± 0,66	13,33 ± 1,50	12,39 ± 1,64	1,05 ± 0,13	32,55 ± 3,57
	4. den	6,68 ± 0,55	13,19 ± 0,33	12,12 ± 0,39	1,05 ± 0,04	33,04 ± 0,55
	7. den	3,71 ± 1,09	13,04 ± 1,06	11,90 ± 0,97	0,96 ± 0,08	29,62 ± 1,61
2. týden	**2. den**	5,94 ± 2,53	11,07 ± 1,08	10,42 ± 0,96	0,95 ± 0,11	28,38 ± 4,00
	4. den	3,36 ± 0,34	8,93 ± 1,03	8,35 ± 1,00	0,64 ± 0,26	21,26 ± 1,87
	7. den	2,86 ± 0,49	9,11 ± 0,29	9,01 ± 0,27	0,71 ± 0,06	21,68 ± 0,70
3. týden	**2. den**	3,37 ± 0,50	9,22 ± 0,36	9,05 ± 0,49	0,78 ± 0,07	22,41 ± 0,86
	4. den	4,76 ± 0,24	10,79 ± 0,26	10,41 ± 0,56	1,07 ± 0,12	27,03 ± 0,54
	7. den	3,39 ± 0,53	9,64 ± 0,68	9,32 ± 0,86	0,92 ± 0,20	23,27 ± 1,94
4. týden	**2. den**	3,80 ± 0,77	8,84 ± 0,27	9,17 ± 0,44	0,83 ± 0,06	22,65 ± 0,23
	4. den	4,16 ± 0,28	8,50 ± 0,17	8,78 ± 0,25	0,84 ± 0,03	22,28 ± 0,38
	7. den	3,52 ± 0,48	7,82 ± 0,83	8,07 ± 0,72	0,78 ± 0,11	20,18 ± 1,82
5. týden	**2. den**	4,92 ± 1,21	7,48 ± 0,37	7,72 ± 0,44	0,79 ± 0,08	20,91 ± 1,51
	4. den	6,28 ± 0,92	7,45 ± 0,40	7,64 ± 0,37	0,84 ± 0,05	22,21 ± 1,16
	7. den	5,10 ± 0,46	7,64 ± 0,27	8,56 ± 0,28	0,95 ± 0,05	22,25 ± 0,36

B



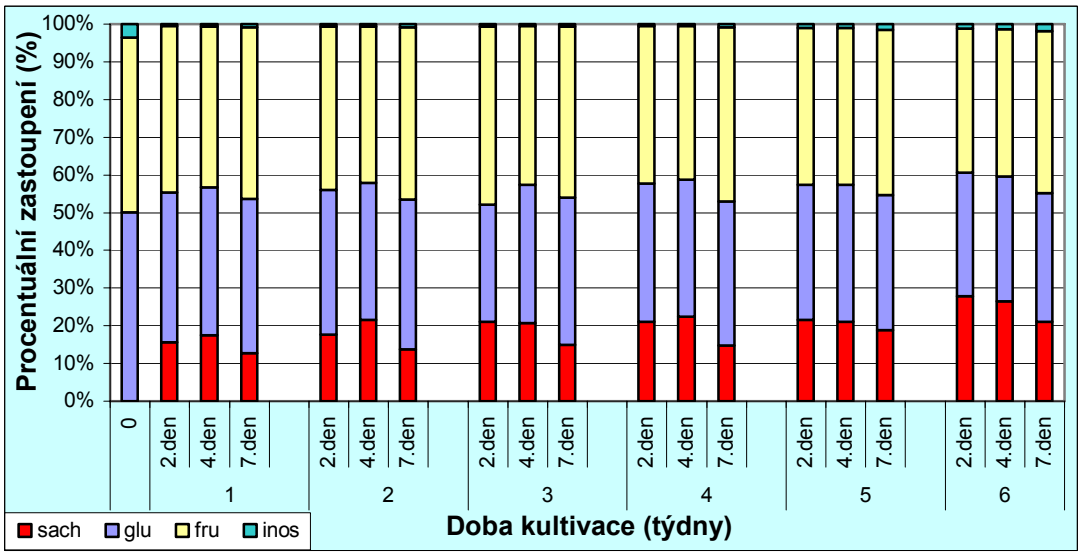
Graf 21: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



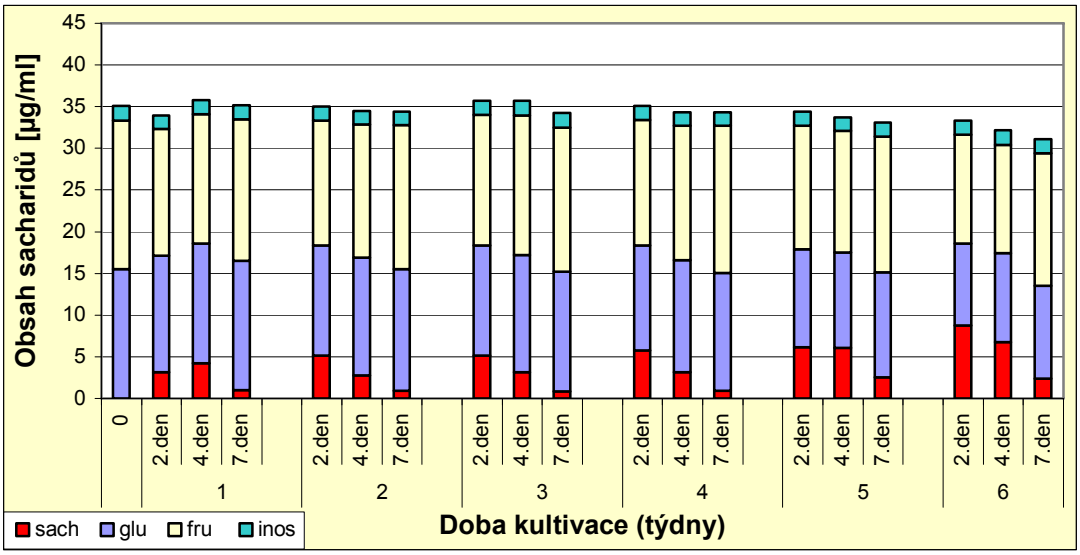
Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0	14,25 ± 0,26	13,21 ± 0,29	1,02 ± 0,05	28,47 ± 0,42
1. týden	**2. den**	4,97 ± 0,78	12,75 ± 0,15	14,09 ± 0,21	0,16 ± 0,02	31,98 ± 0,56
	4. den	5,66 ± 1,24	12,77 ± 0,55	13,80 ± 0,60	0,24 ± 0,03	32,48 ± 0,16
	7. den	4,05 ± 1,12	13,08 ± 0,72	14,55 ± 0,63	0,29 ± 0,09	31,97 ± 1,43
2. týden	**2. den**	5,43 ± 1,11	11,82 ± 2,55	13,34 ± 2,90	0,23 ± 0,08	30,82 ± 6,51
	4. den	7,10 ± 1,28	11,98 ± 0,80	13,68 ± 0,94	0,20 ± 0,04	32,96 ± 1,93
	7. den	4,18 ± 0,76	12,04 ± 0,83	13,90 ± 0,85	0,24 ± 0,02	30,35 ± 1,34
3. týden	**2. den**	6,21 ± 0,81	9,19 ± 6,05	13,98 ± 0,26	0,19 ± 0,01	29,57 ± 6,39
	4. den	6,57 ± 0,57	11,60 ± 1,46	13,37 ± 1,76	0,16 ± 0,04	31,70 ± 3,68
	7. den	4,80 ± 0,58	12,57 ± 0,26	14,52 ± 0,37	0,24 ± 0,09	32,12 ± 0,51
4. týden	**2. den**	6,71 ± 0,63	11,74 ± 0,88	13,34 ± 0,79	0,18 ± 0,13	31,97 ± 1,28
	4. den	6,73 ± 1,07	10,84 ± 1,40	12,18 ± 1,68	0,15 ± 0,05	29,90 ± 3,52
	7. den	5,15 ± 1,25	13,29 ± 1,39	16,13 ± 1,09	0,28 ± 0,08	34,85 ± 3,81
5. týden	**2. den**	7,51 ± 0,17	12,52 ± 2,82	14,50 ± 2,86	0,35 ± 0,04	34,88 ± 5,56
	4. den	8,25 ± 0,10	14,35 ± 0,62	16,34 ± 0,74	0,39 ± 0,04	39,33 ± 1,49
	7. den	6,12 ± 0,97	11,66 ± 2,33	14,25 ± 2,66	0,51 ± 0,08	32,54 ± 5,41
6. týden	**2. den**	8,26 ± 0,44	9,65 ± 0,55	11,31 ± 0,45	0,35 ± 0,09	29,58 ± 0,70
	4. den	7,53 ± 1,05	9,41 ± 0,44	11,11 ± 0,57	0,36 ± 0,05	28,42 ± 1,79
	7. den	5,65 ± 0,56	9,16 ± 1,31	11,56 ± 0,66	0,50 ± 0,07	26,87 ± 2,47

B



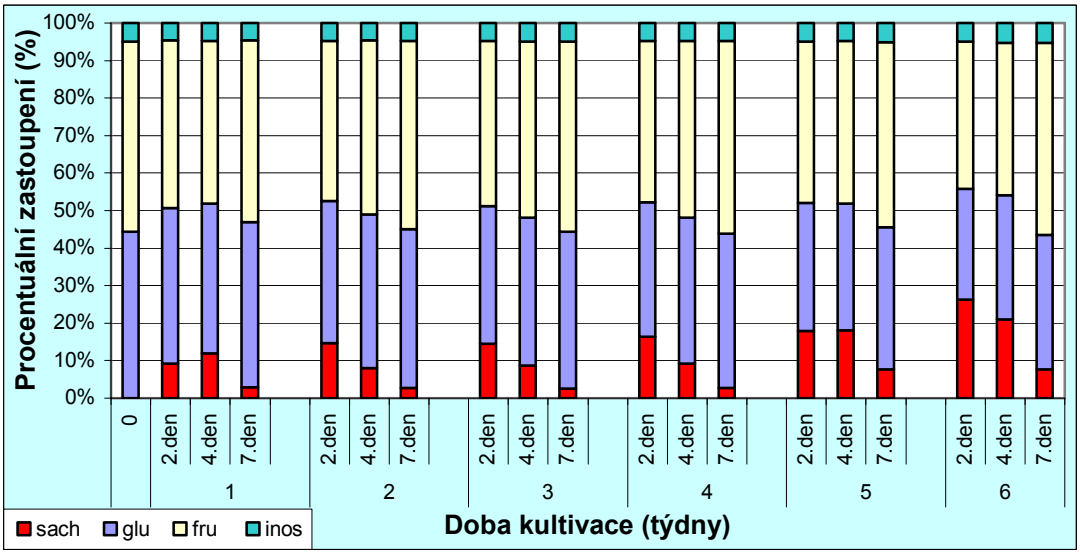
Graf 22: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F↑</u>; A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



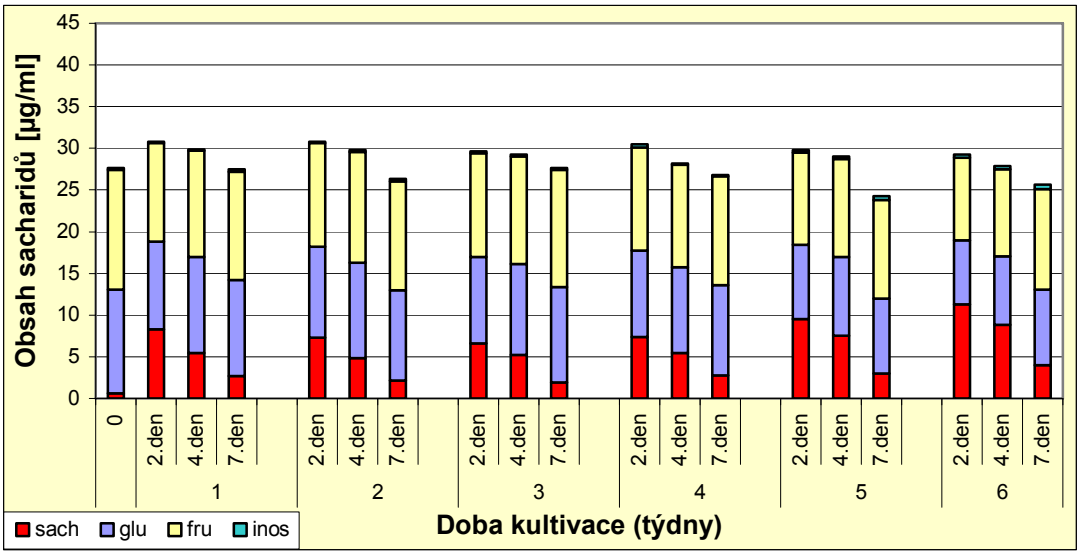
Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0	15,54 ± 0,45	17,80 ± 1,21	1,74 ± 0,19	35,08 ± 1,73
1. týden	**2. den**	3,15 ± 1,45	14,01 ± 1,67	15,20 ± 2,01	1,54 ± 0,09	33,91 ± 2,73
	4. den	4,26 ± 0,23	14,32 ± 0,31	15,55 ± 0,49	1,70 ± 0,10	35,82 ± 0,62
	7. den	1,02 ± 0,29	15,49 ± 0,30	17,00 ± 0,35	1,64 ± 0,06	35,15 ± 0,74
2. týden	**2. den**	5,12 ± 0,76	13,26 ± 0,40	14,94 ± 0,64	1,66 ± 0,04	34,99 ± 0,45
	4. den	2,76 ± 0,30	14,13 ± 0,47	15,96 ± 0,54	1,60 ± 0,07	34,46 ± 1,05
	7. den	0,95 ± 0,25	14,55 ± 0,30	17,26 ± 0,18	1,63 ± 0,06	34,39 ± 0,25
3. týden	**2. den**	5,18 ± 0,53	13,14 ± 0,49	15,70 ± 0,44	1,71 ± 0,12	35,73 ± 1,47
	4. den	3,13 ± 0,34	14,07 ± 0,49	16,77 ± 0,54	1,74 ± 0,11	35,70 ± 1,20
	7. den	0,86 ± 0,14	14,31 ± 0,12	17,33 ± 0,19	1,71 ± 0,03	34,22 ± 0,19
4. týden	**2. den**	5,75 ± 0,33	12,60 ± 0,29	15,07 ± 0,38	1,67 ± 0,05	35,09 ± 0,33
	4. den	3,16 ± 0,45	13,39 ± 0,82	16,12 ± 0,96	1,67 ± 0,08	34,34 ± 2,13
	7. den	0,95 ± 0,47	14,10 ± 0,50	17,62 ± 0,49	1,62 ± 0,04	34,30 ± 0,71
5. týden	**2. den**	6,16 ± 0,42	11,74 ± 0,34	14,82 ± 0,15	1,69 ± 0,03	34,40 ± 0,79
	4. den	6,09 ± 1,73	11,41 ± 1,33	14,64 ± 1,21	1,62 ± 0,03	33,75 ± 1,05
	7. den	2,57 ± 0,27	12,54 ± 0,55	16,28 ± 0,42	1,71 ± 0,07	33,10 ± 0,83
6. týden	**2. den**	8,74 ± 2,18	9,85 ± 1,18	13,07 ± 1,25	1,64 ± 0,08	33,31 ± 0,83
	4. den	6,75 ± 1,02	10,66 ± 0,56	13,03 ± 2,52	1,71 ± 0,05	32,15 ± 1,82
	7. den	2,41 ± 0,26	11,09 ± 0,49	15,91 ± 0,55	1,66 ± 0,04	31,06 ± 0,97

B



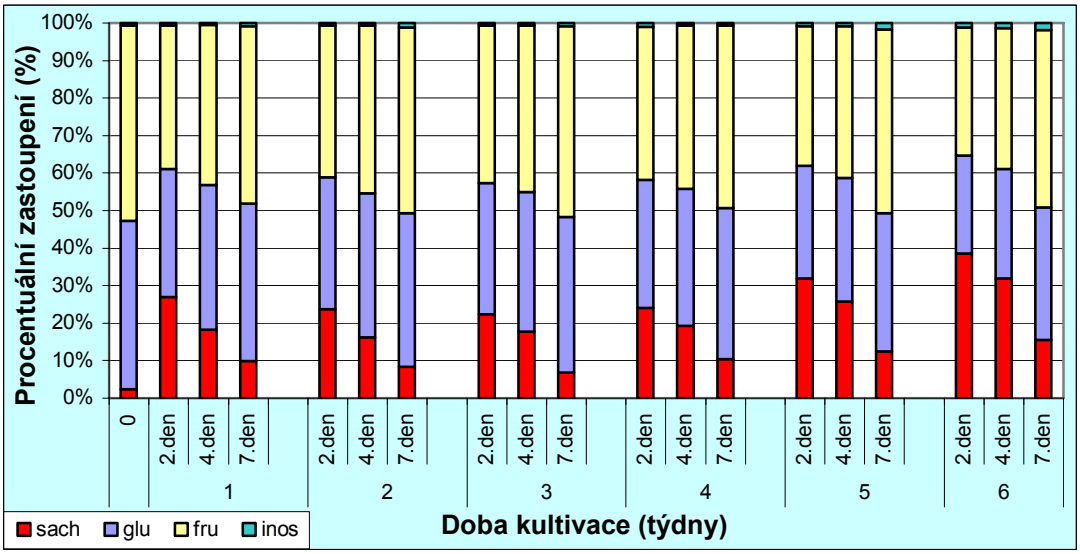
Graf 23: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F↑</u> (1. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



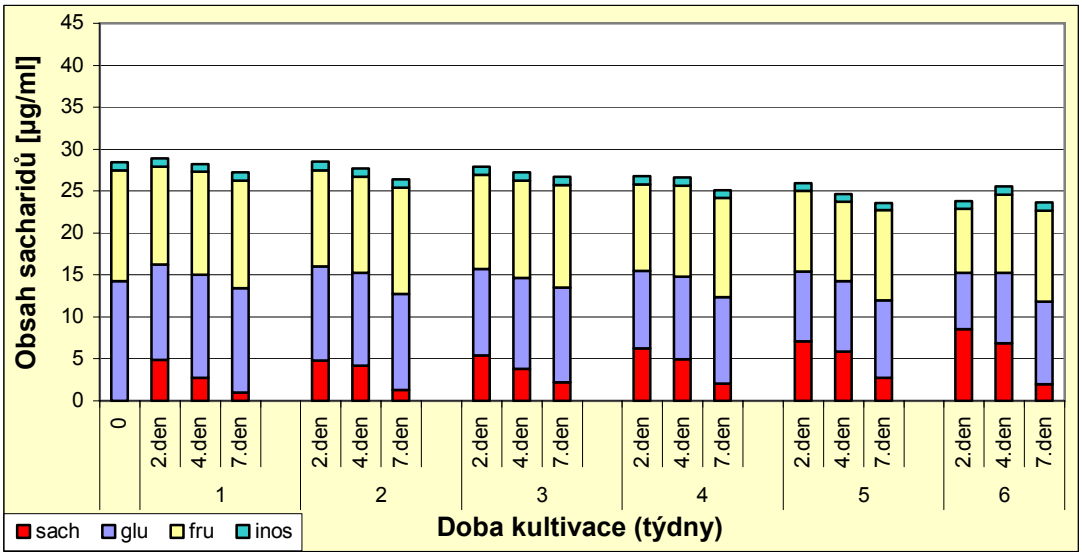
Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0,65 ± 0,28	12,40 ± 0,17	14,39 ± 0,25	0,21 ± 0,04	27,66 ± 0,65
1. týden	**2. den**	8,31 ± 0,68	10,52 ± 0,22	11,78 ± 0,16	0,20 ± 0,11	30,81 ± 0,90
	4. den	5,44 ± 0,47	11,54 ± 0,33	12,73 ± 0,34	0,16 ± 0,01	29,87 ± 0,79
	7. den	2,72 ± 0,10	11,53 ± 0,08	12,97 ± 0,14	0,24 ± 0,04	27,45 ± 0,15
2. týden	**2. den**	7,31 ± 0,77	10,86 ± 0,37	12,43 ± 0,43	0,23 ± 0,04	30,83 ± 1,14
	4. den	4,86 ± 0,63	11,44 ± 0,65	13,30 ± 0,74	0,21 ± 0,02	29,81 ± 1,26
	7. den	2,18 ± 0,23	10,82 ± 0,35	13,05 ± 0,34	0,30 ± 0,08	26,36 ± 0,79
3. týden	**2. den**	6,62 ± 0,79	10,37 ± 0,14	12,45 ± 0,09	0,20 ± 0,03	29,64 ± 0,72
	4. den	5,21 ± 1,23	10,90 ± 0,19	12,95 ± 0,40	0,22 ± 0,05	29,27 ± 0,69
	7. den	1,90 ± 0,27	11,47 ± 0,38	14,05 ± 0,52	0,23 ± 0,05	27,64 ± 0,98
4. týden	**2. den**	7,34 ± 0,46	10,38 ± 0,28	12,41 ± 0,19	0,33 ± 0,29	30,46 ± 0,36
	4. den	5,43 ± 0,82	10,33 ± 0,82	12,29 ± 0,99	0,17 ± 0,03	28,22 ± 2,62
	7. den	2,79 ± 0,38	10,78 ± 0,23	13,04 ± 0,27	0,20 ± 0,01	26,81 ± 0,67
5. týden	**2. den**	9,52 ± 0,76	8,93 ± 0,66	11,08 ± 0,70	0,24 ± 0,03	29,76 ± 1,22
	4. den	7,49 ± 0,55	9,51 ± 0,42	11,74 ± 0,36	0,24 ± 0,04	28,99 ± 0,75
	7. den	3,01 ± 0,68	8,95 ± 0,43	11,86 ± 0,17	0,43 ± 0,10	24,25 ± 1,00
6. týden	**2. den**	11,29 ± 0,58	7,65 ± 0,10	9,97 ± 0,09	0,37 ± 0,04	29,27 ± 0,59
	4. den	8,86 ± 1,05	8,15 ± 0,69	10,48 ± 0,65	0,36 ± 0,03	27,85 ± 0,55
	7. den	3,96 ± 0,15	9,08 ± 0,31	12,11 ± 0,40	0,46 ± 0,01	25,61 ± 0,55

B



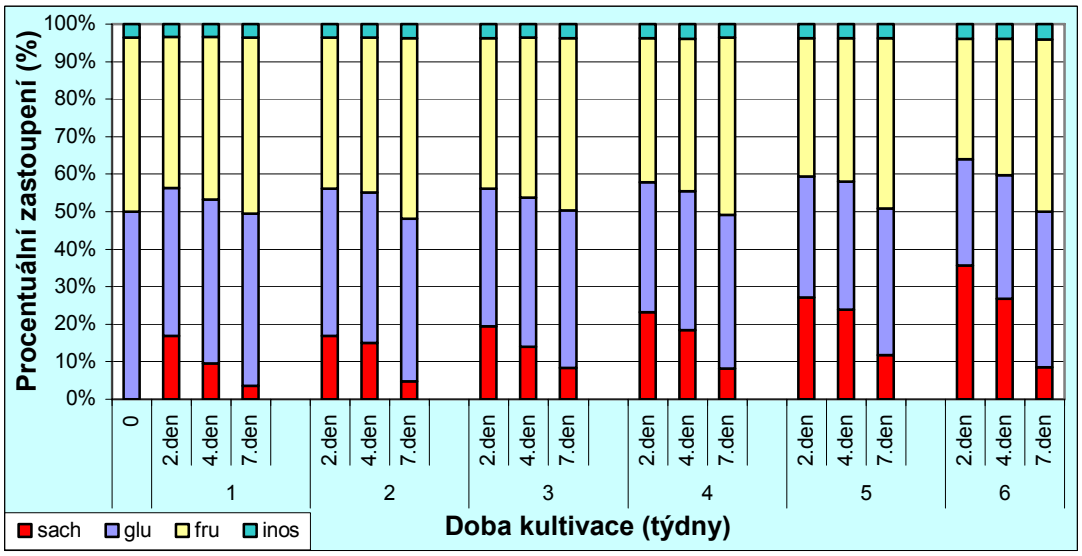
Graf 24: Obsah sacharidů v tekutém maturačním médiu během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta G+F↑</u> (2. opakování); A – obsah sacharidů, B – procentuální zastoupení sacharidů, 0 – proliferační médium; 2., 4., 7. den – maturační médium 2., 4., 7. den v týdnu. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4.

A



Doba kultivace	Den v subkult. intervalu	Obsah sacharidů [µg/ml]				
		sacharóza	glukóza	fruktóza	inositol	celkový obsah
0. týden		0	14,25 ± 0,26	13,21 ± 0,29	1,02 ± 0,05	28,47 ± 0,42
1. týden	**2. den**	4,87 ± 0,31	11,39 ± 0,09	11,64 ± 0,25	0,98 ± 0,03	28,88 ± 0,10
	4. den	2,72 ± 0,54	12,31 ± 0,15	12,28 ± 0,26	0,95 ± 0,14	28,26 ± 0,66
	7. den	0,96 ± 0,34	12,50 ± 0,32	12,74 ± 0,43	0,99 ± 0,04	27,20 ± 0,43
2. týden	**2. den**	4,84 ± 0,35	11,17 ± 0,27	11,46 ± 0,38	1,04 ± 0,03	28,50 ± 0,36
	4. den	4,16 ± 0,58	11,07 ± 0,23	11,45 ± 0,23	0,99 ± 0,03	27,68 ± 0,26
	7. den	1,27 ± 0,26	11,44 ± 0,75	12,67 ± 0,68	0,99 ± 0,06	26,38 ± 1,52
3. týden	**2. den**	5,42 ± 0,88	10,27 ± 0,21	11,21 ± 0,36	1,04 ± 0,03	27,94 ± 0,36
	4. den	3,83 ± 0,37	10,79 ± 0,45	11,63 ± 0,35	0,99 ± 0,06	27,24 ± 1,21
	7. den	2,22 ± 1,27	11,24 ± 0,44	12,24 ± 0,84	1,01 ± 0,01	26,71 ± 0,64
4. týden	**2. den**	6,22 ± 0,70	9,28 ± 0,93	10,30 ± 0,81	1,00 ± 0,10	26,80 ± 1,86
	4. den	4,92 ± 0,23	9,88 ± 0,35	10,82 ± 0,05	1,03 ± 0,03	26,65 ± 0,39
	7. den	2,05 ± 0,55	10,28 ± 0,41	11,82 ± 0,30	0,91 ± 0,02	25,06 ± 0,62
5. týden	**2. den**	7,06 ± 0,33	8,35 ± 0,24	9,57 ± 0,33	0,97 ± 0,04	25,96 ± 0,65
	4. den	5,89 ± 0,89	8,37 ± 0,83	9,43 ± 0,83	0,91 ± 0,13	24,60 ± 2,53
	7. den	2,77 ± 0,39	9,23 ± 0,17	10,71 ± 0,31	0,88 ± 0,04	23,59 ± 0,57
6. týden	**2. den**	8,50 ± 0,95	6,72 ± 0,61	7,64 ± 0,76	0,92 ± 0,06	23,79 ± 0,98
	4. den	6,84 ± 0,72	8,44 ± 0,25	9,29 ± 0,24	1,01 ± 0,11	25,58 ± 0,74
	7. den	2,02 ± 0,32	9,81 ± 0,63	10,85 ± 2,08	0,97 ± 0,13	23,65 ± 2,53

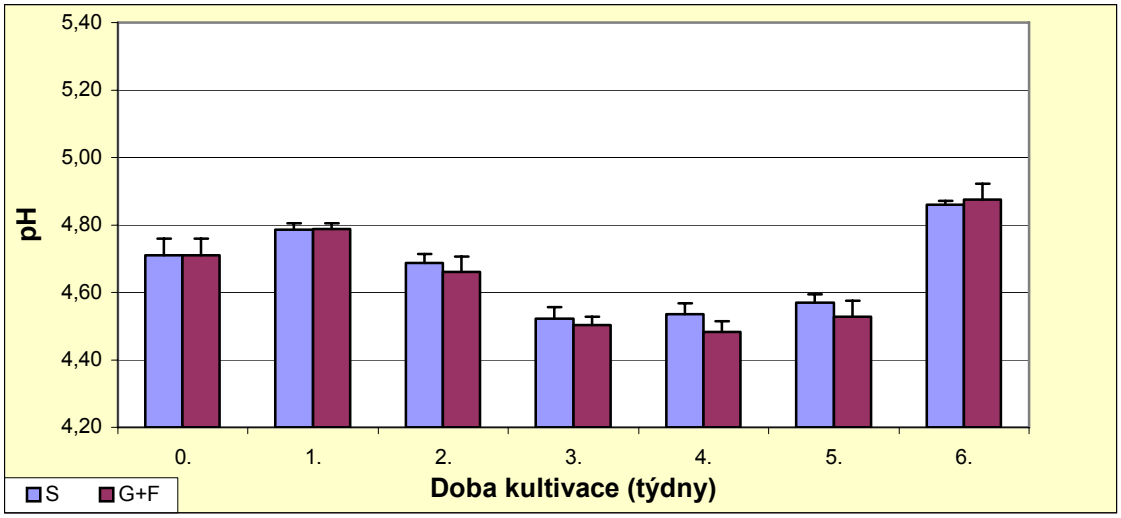
B



4.1.3. Změny pH maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*

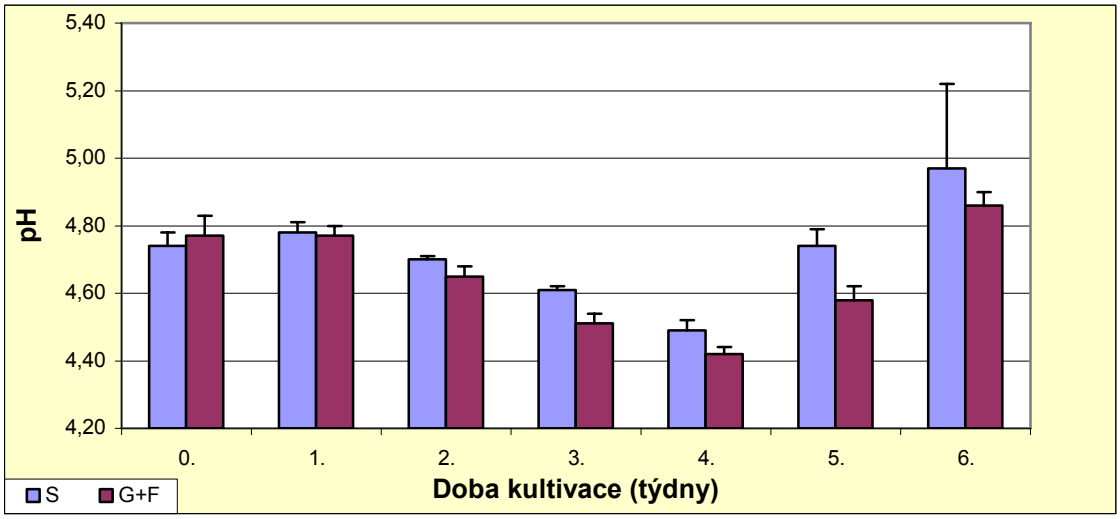
Zjištěné hodnoty pH byly v rozmezí od minimální hodnoty 4,53 do maximální hodnoty 5,26. U všech experimentálních variant (S, G+F, S↑, G+F↑) byla pozorována podobná dynamika pH maturačního média během 6-ti týdnů zrání somatických embryí. Od prvního týdne zrání pH média klesalo až k třetímu týdnu zrání. Ve třetím týdnu zrání byly zjištěné hodnoty pH nejnižší. Od čtvrtého týdne zrání byl pozorován opětovný nárůst pH až do konce šestého týdne zrání. Nejnižší zjištěné hodnoty pH média byly u variant s týdenním subkultivačním intervalem (S a G+F) průměrně o 0,15 nižší, než nejnižší hodnoty pH média u variant se zkráceným sukultivačním intervalem (S↑, G+F↑).

Graf 25: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, varianta S, varianta G+F; 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – pH média na konci 1. až 6. týdne zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4, úsečky – STD.



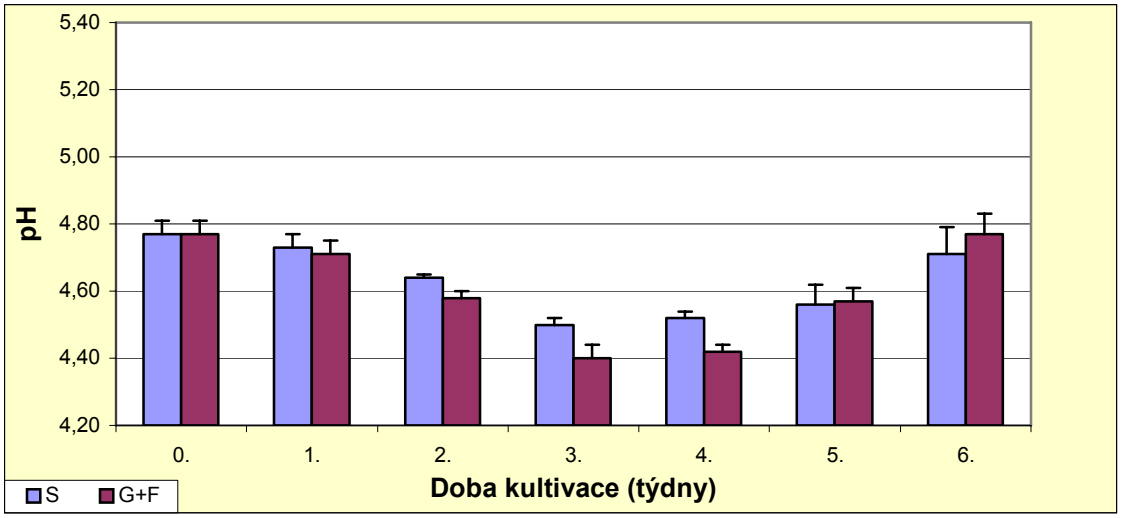
Hodnoty pH média							
	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
S	4,71± 0,05	4,79± 0,02	4,69± 0,03	4,52± 0,03	4,54± 0,03	4,57± 0,02	4,86± 0,01
G+F	4,71± 0,05	4,79± 0,02	4,66 ±0,05	4,50 ±0,02	4,48± 0,03	4,53± 0,05	4,88± 0,05

Graf 26: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, varianta S, varianta G+F (opakování 1); 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – pH média na konci 1. až 6. týdne zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4, úsečky – STD.



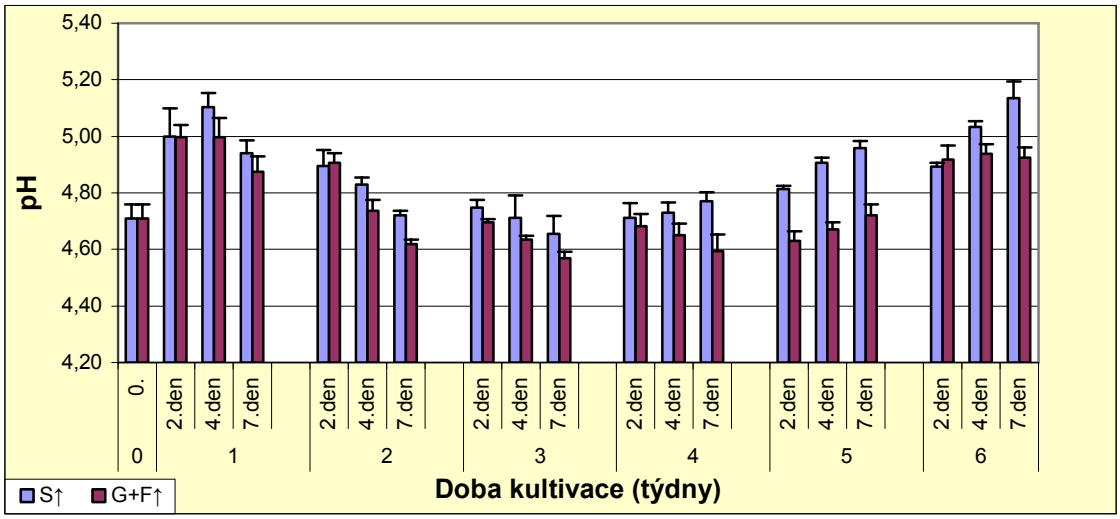
Hodnoty pH média							
	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
S	4,74 ±0,04	4,78 ±0,03	4,70 ±0,01	4,61 ±0,01	4,49 ±0,03	4,74± 0,05	4,97± 0,25
G+F	4,77 ±0,06	4,77 ±0,03	4,65 ±0,03	4,51 ±0,03	4,42 ±0,02	4,58 ±0,04	4,86± 0,04

Graf 27: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S</u>, <u>varianta G+F</u> (opakování 2); 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – pH média na konci 1. až 6. týdne zrání. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4, úsečky – STD.



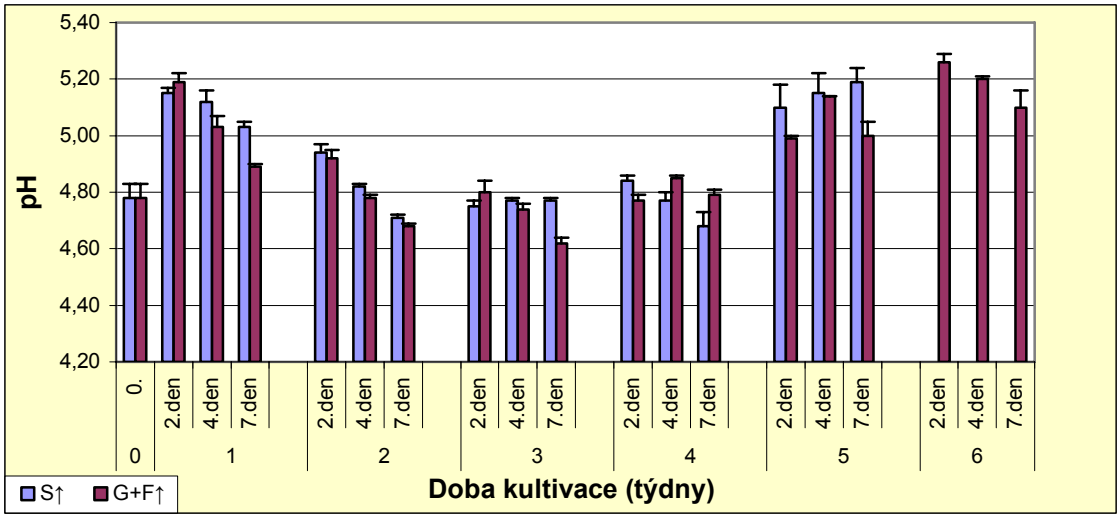
Hodnoty pH média							
	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
S	4,77 ±0,04	4,73 ±0,04	4,64 ±0,01	4,50 ±0,02	4,52 ±0,02	4,56± 0,06	4,71 ±0,08
G+F	4,77 ±0,04	4,71 ±0,04	4,58 ±0,02	4,40 ±0,04	4,42 ±0,02	4,57± 0,04	4,77 ±0,06

Graf 28: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u>, <u>varianta G+F↑</u>; 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – 1. až 6. týden zrání; 2., 4., 7. den – pH na konci subkultivačních intervalů. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, úsečky – STD, n = 4.



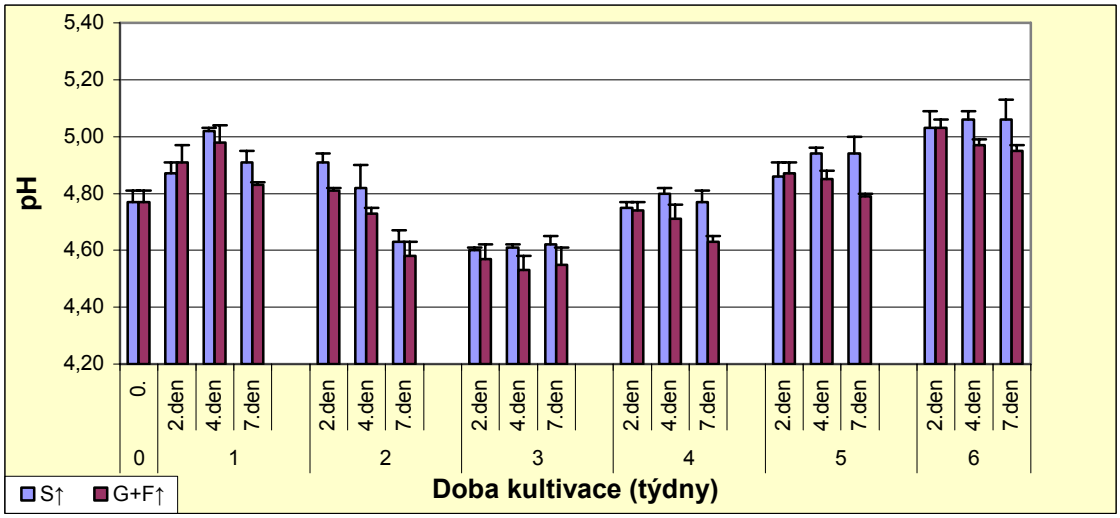
Hodnoty pH média						
S↑	**1.týden**	**2.týden**	**3.týden**	**4.týden**	**5.týden**	**6.týden**
2.den	5,00±0,10	4,90±0,06	4,75±0,03	4,71±0,05	4,81±0,01	4,89±0,02
4.den	5,10±0,05	4,83±0,02	4,71±0,08	4,73±0,04	4,91±0,02	5,03±0,02
7.den	4,94±0,05	4,72±0,02	4,66±0,06	4,77±0,03	4,96±0,03	5,14±0,06
G+F↑						
2.den	5,00±0,04	4,91±0,03	4,70±0,01	4,68±0,04	4,63±0,03	4,92±0,05
4.den	5,00±0,07	4,74±0,04	4,64±0,01	4,65±0,04	4,67±0,03	4,94±0,04
7.den	4,88±0,05	4,62±0,01	4,57±0,02	4,60±0,06	4,72±0,04	4,93±0,04

Graf 29: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u>, <u>varianta G+F↑</u> (1. opakování); 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – 1. až 6. týden zrání; 2., 4., 7. den – pH na konci subkultivačních intervalů. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, úsečky – STD, n = 4.



Hodnoty pH média						
S↑	**1.týden**	**2.týden**	**3.týden**	**4.týden**	**5.týden**	**6.týden**
2.den	5,15±0,02	4,94±0,03	4,75±0,02	4,84±0,02	5,10±0,08	
4.den	5,12±0,04	4,82±0,01	4,77±0,01	4,77±0,03	5,15±0,07	
7.den	5,03±0,02	4,71±0,01	4,77±0,01	4,68±0,05	5,19±0,05	
G+F↑						
2.den	5,19±0,03	4,92±0,03	4,80±0,04	4,77±0,02	4,99±0,01	5,26±0,03
4.den	5,03±0,04	4,78±0,01	4,74±0,02	4,85±0,01	5,14±0,00	5,20±0,01
7.den	4,89±0,01	4,68±0,01	4,68±0,02	4,79±0,02	5,00±0,05	5,10±0,06

Graf 30: Hodnoty pH tekutého maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*, <u>varianta S↑</u>, <u>varianta G+F↑</u> (2. opakování); 0. – pH média po týdnu proliferace; 1. až 6. – 1. až 6. týden zrání; 2., 4., 7. den – pH na konci subkultivačních intervalů. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, úsečky – STD, n = 4.



Hodnoty pH média						
S↑	**1.týden**	**2.týden**	**3.týden**	**4.týden**	**5.týden**	**6.týden**
2.den	4,87±0,04	4,91±0,03	4,60±0,02	4,75±0,02	4,86±0,05	5,03±0,06
4.den	5,02±0,01	4,82±0,08	4,61±0,02	4,80±0,02	4,94±0,02	5,06±0,03
7.den	4,91±0,04	4,63±0,04	4,62±0,04	4,77±0,04	4,94±0,06	5,06±0,07
G+F↑						
2.den	4,91±0,06	4,81±0,01	4,57±0,05	4,74±0,03	4,87±0,04	5,03±0,03
4.den	4,98±0,06	4,73±0,02	4,53±0,05	4,71±0,05	4,85±0,03	4,97±0,02
7.den	4,83±0,01	4,58±0,05	4,55±0,06	4,63±0,02	4,79±0,01	4,95±0,02

4.1.4. Výtěžky zralých somatických embryí

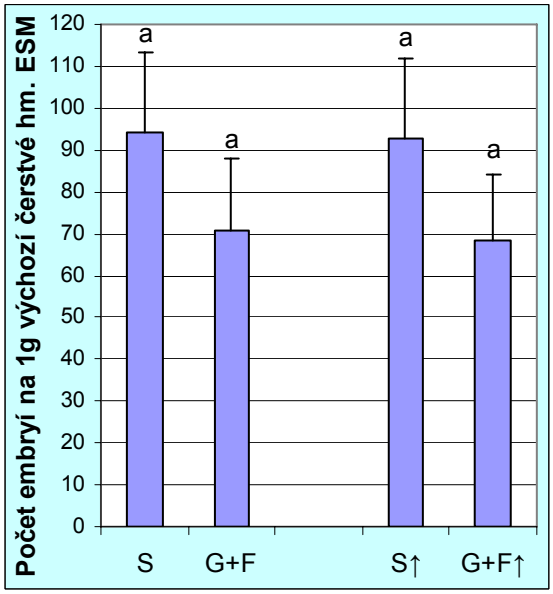
Graf 31 prezentuje výtěžky zralých somatických embryí na 1 g výchozí čerstvé hmotnosti jednotlivých experimentálních variant. Průměrné výtěžky zralých somatických embryí byly v rozmezí od 68 do 94 embryí na 1 g výchozí čerstvé hmotnosti ESM. Rozdíl mezi experimentálními variantami ve výtěžcích zralých embryí byl statisticky neprůkazný.

V prvním opakování experimentu (Graf 32) byly průměrné výtěžky zralých somatických embryí v rozmezí od 49 do 89 embryí na 1 g výchozí čerstvé hmotnosti ESM. Počet zralých embryí byl vyšší na médiu se 3% sacharózou a subkultivačním intervalem 1 týden (varianta S) oproti ostatním variantám.

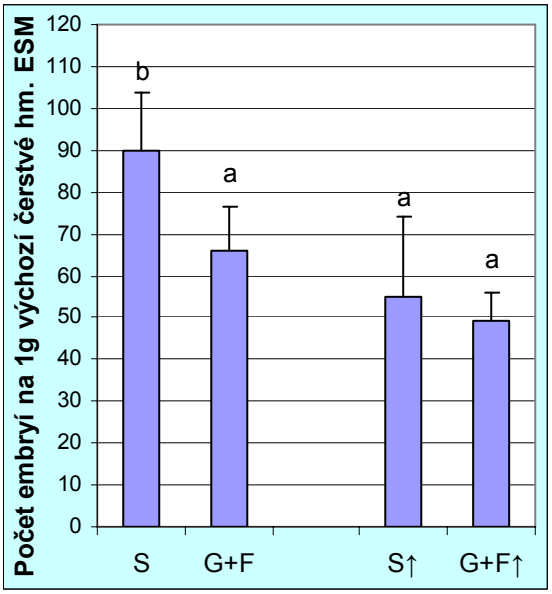
V druhém opakování experimentu (Graf 33) byly průměrné výtěžky zralých somatických embryí v rozmezí od 34 do 51 na 1 g výchozí čerstvé hmotnosti ESM. Počet zralých embryí byl vyšší u varianty S než u varianty G+F↑. Rozdíly mezi ostatními variantami byly statisticky neprůkazné.

Ve všech opakováních experimentu lze pozorovat nižší výtěžky zralých SE u přenášených variant (S↑, G+F↑), v porovnání s nepřenášenou variantou S, i když statisticky nejsou tyto rozdíly vždy průkazné. Rozdíl ve výtěžcích mezi variantami S a G+F také nebyl vždy statisticky průkazný, ale všech opakováních lze pozorovat tendenci k horším výtěžkům u varianty G+F, oproti variantě S.

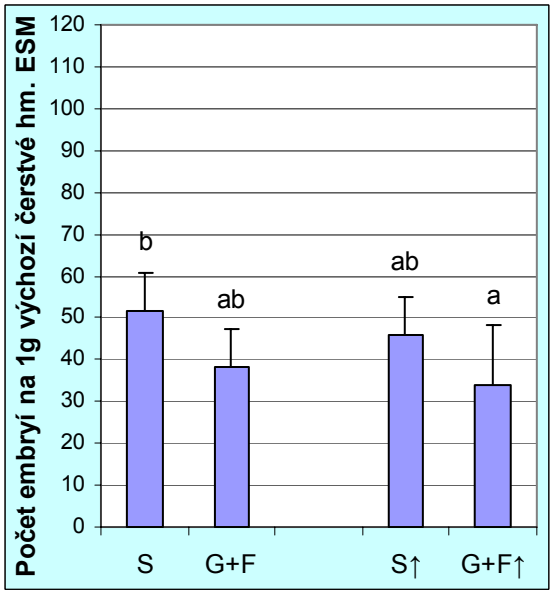
Graf 31: Výtěžky somatických embryí *Picea abies* – počet vytvořených embryí na konci 6.týdne zrání na 1g výchozí čerstvé hmotnosti ESM, <u>varianty S</u>, <u>G+F</u>, <u>S↑</u>, <u>G+F↑</u>; Graf 32: 1. opakování; Graf 33: 2. opakování; Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 8, úsečky – STD. Odlišná písmena nad sloupci (a, b, c) označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



Graf 31



Graf 32 (1. opakování)



Graf 33 (2. opakování)

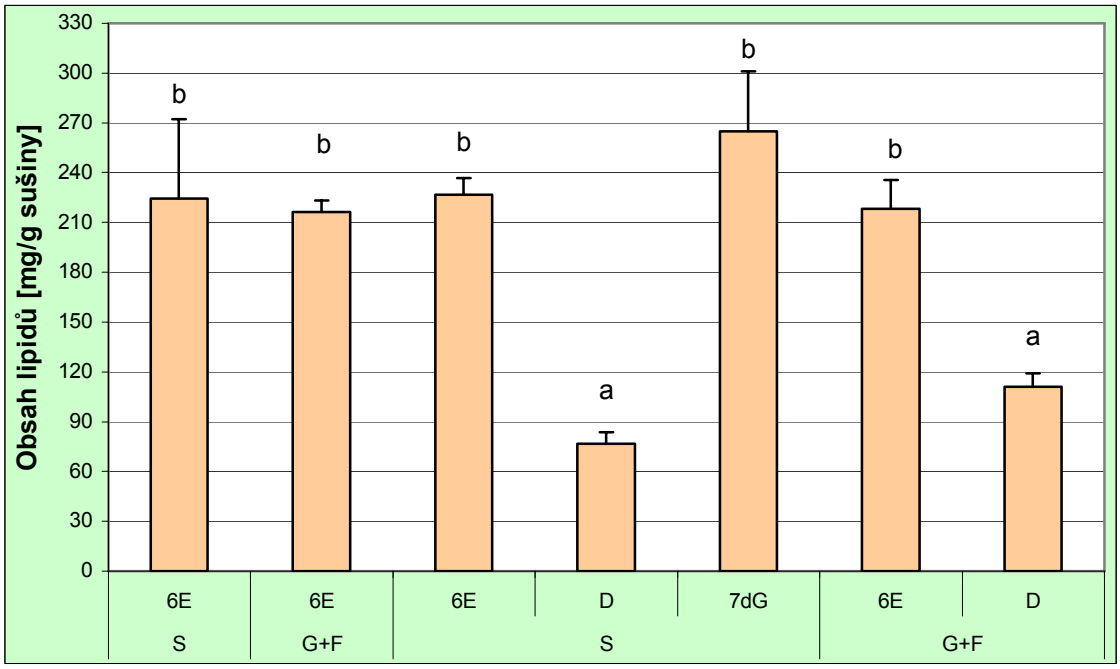
Počet embryí na 1g čerstvé hm. ESM	S	G+F	S↑	G+F↑
Graf 31	94,22 ± 18,92	70,69 ± 17,41	92,55 ± 19,39	68,59 ± 15,72
Graf 32 (1. opakování)	89,94 ± 19,77	66,17 ± 10,35	54,79 ± 19,19	49,14 ± 6,99
Graf 33 (2. opakování)	51,40 ± 9,41	38,07 ± 9,09	45,95 ± 8,88	34,16 ± 13,99

4.1.5. Obsah zásobních látek

4.1.5.1. Lipidy

Obsah lipidů v somatických embryích na konci zrání byl v rozmezí od 216 do 226 mg na 1 g sušiny u všech variant. Mezi variantami nebyl prokázán statistický rozdíl v obsahu lipidů na konci zrání. U varianty S↑ a G+F↑ byl stanoven obsah lipidů na konci desikační fáze. U obou variant došlo k poklesu obsahu lipidů během desikace na hodnoty 76 a 111 mg na 1 g sušiny. Desikovaná embrya obsahovala statisticky nižší množství lipidů, než embrya na konci zrání u obou variant. U varianty S↑ byl stanoven také průměrný obsah lipidů v somatických embryích po prvním týdnu klíčení. Embrya obsahovala 264 mg na 1 g sušiny. Obsah lipidů se tedy během prvního týdne klíčení téměř zečtyřnásobil oproti obsahu lipidů na konci desikace.

Graf 34: Obsah lipidů (mg/g sušiny) na konci zrání somatických embryí *Picea abies*, varianty S, G+F, S↑, G+F↑; 6E – izolovaná embrya na konci zrání; D – embrya po desikaci; 7dG – embrya po 7 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4-6 , úsečky – STD. Odlišná písmena nad sloupci (a, b, c) označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



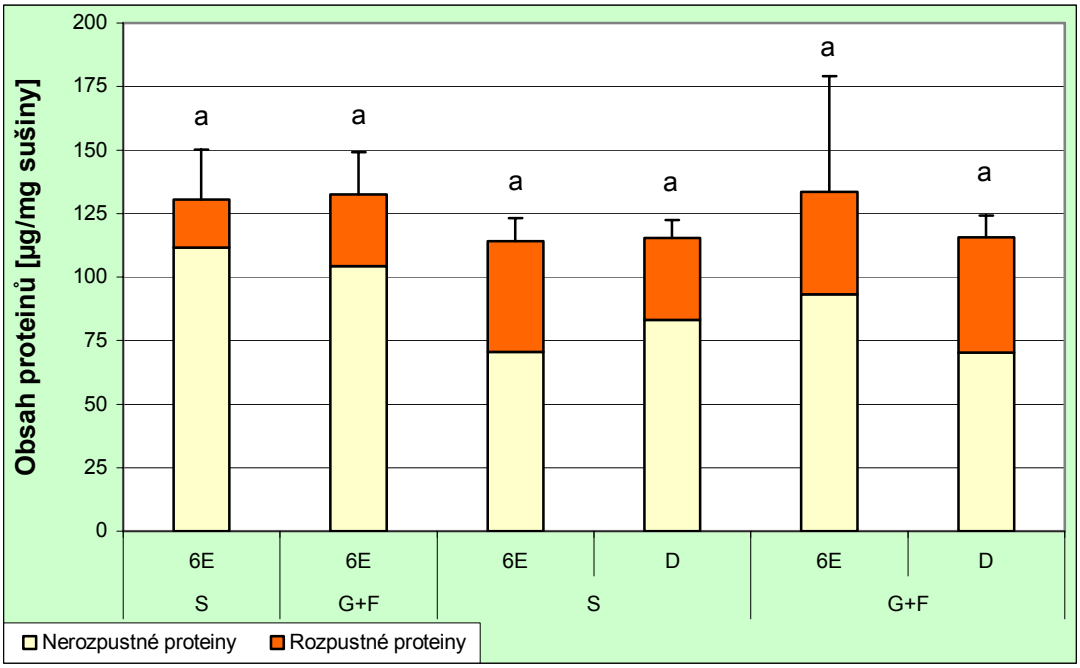
Varianta	Obsah lipidů [mg/g sušiny]		
	6E	D	7dG
S	224,23 ± 47,76		
G+F	216,32 ± 6,72		
S↑	226,64 ± 10,01	76,53 ± 7,01	264,82 ± 36,1
G+F↑	218,29 ± 17,17	111,21 ± 7,87	

4.1.5.2. Proteiny

Obsah celkových proteinů byl na konci zrání u všech variant přibližně 125 µg/mg sušiny. Mezi experimentálními variantami nebyl prokázán statistický rozdíl v obsahu proteinů. U varianty S↑ a G+F↑ byl stanoven obsah proteinů i po desikaci. Desikovaná embrya vykazovala stejný obsah proteinů, jako zralá embrya.

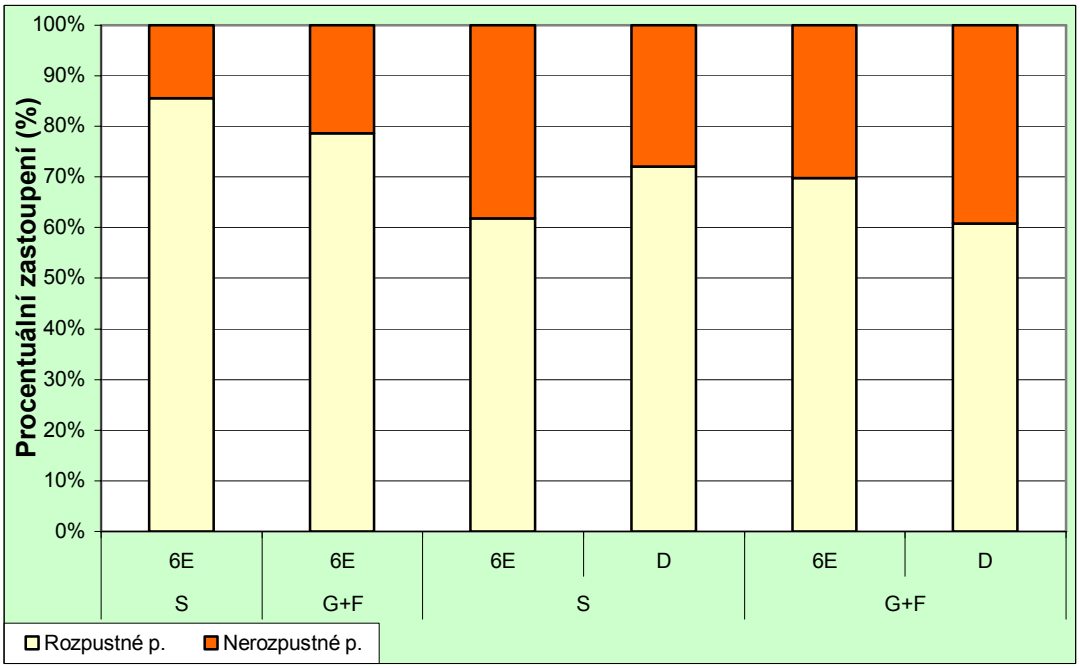
Graf 35: Obsah proteinů (µg/mg sušiny) na konci zrání a desikace somatických embryí *Picea abies*, varianty S, G+F, S↑, G+F↑; A – obsah proteinů, B – procentuální zastoupení rozpustných a nerozpustných proteinů; 6E – izolovaná embrya na konci zrání; D – embrya po desikaci; Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 4-6 , úsečky – STD. Odlišná písmena nad sloupci (a, b, c) označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.

A



Varianta	Obsah proteinů [µg/mg sušiny]	
	6E	D
S	114,22 ± 19,81	
G+F	115,44 ± 16,60	
S↑	133,52 ± 8,90	115,68 ± 6,86
G+F↑	132,53 ± 45,57	130,42 ± 8,52

B



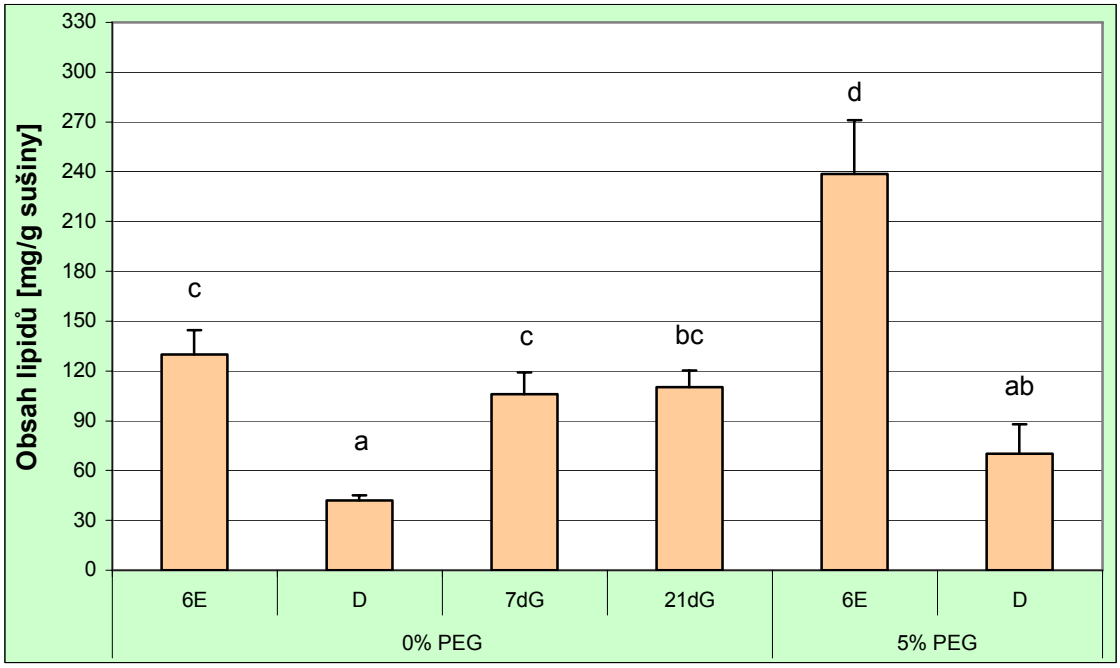
4.2. Vliv osmotického stresu na obsah zásobních látek

Při sledování vlivu osmotického stresu na obsah lipidů a proteinů v somatických embryích byl aplikován do maturačního média PEG (5%). Takto zrající embrya byla na konci zrání porovnávána s embryi, která zrála na maturačním médiu bez PEG (0%).

4.2.1. Obsah lipidů

Embrya zrající na médiu s 5% PEG obsahovala po šesti týdnech zrání větší množství lipidů (mg/g sušiny), než embrya zrající na médiu bez přítomnosti PEG (Graf 36). U obou experimentálních variant byl pozorován výrazný pokles v obsahu lipidů během desikace. Obsah lipidů po prvním a třetím týdnu klíčení byl zjištěn pouze u varianty 0% PEG. Po prvním týdnu kultivace desikovaných embryí na germinačním médiu došlo k nárůstu obsahu lipidů. Obsah lipidů zjištěný po prvním týdnu klíčení byl shodný s hodnotami zjištěnými po třetím týdnu klíčení.

Graf 36: Obsah lipidů (mg/g sušiny) na konci zrání a během klíčení somatických embryí *Picea abies*, embrya zrající na médiu s 0% a 5% PEG; 6E – izolovaná embrya na konci zrání; D – embrya po desikaci; 7dG, 21dG – embrya po 3, 21 dnech klíčení. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 3 až 5. Odlišná písmena nad sloupci (a, b, c, d) označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.

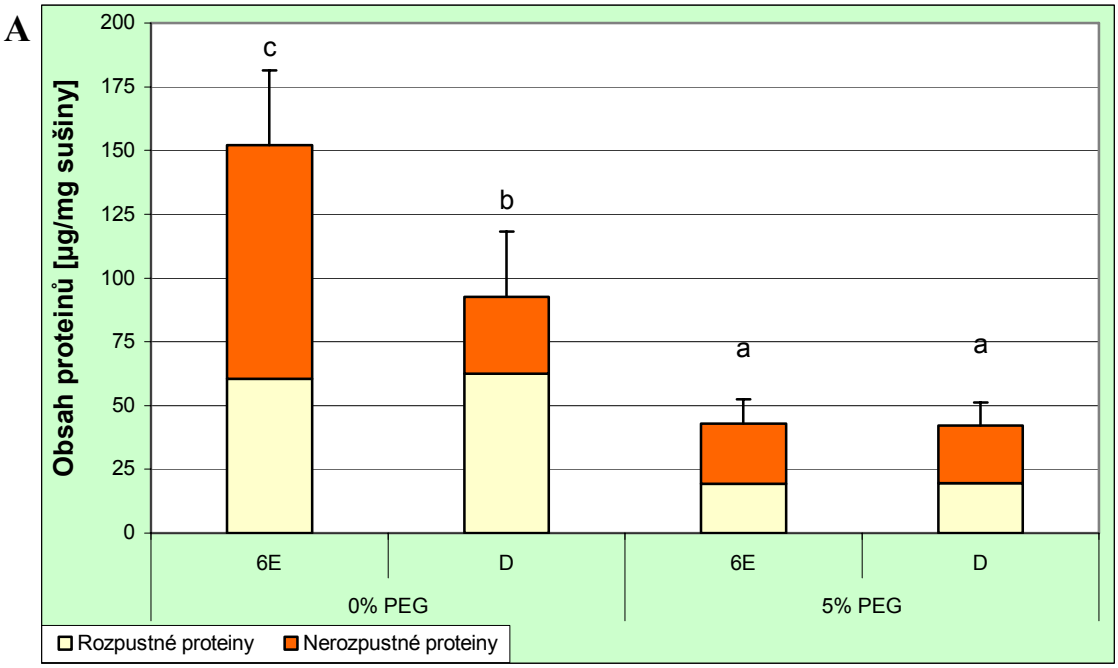


Varianta	Obsah lipidů [mg/g sušiny]			
	6E	D	7dG	21dG
0% PEG	129,9 ± 14,5	41,9 ± 3,3	105,9 ± 12,9	110,3 ± 9,9
5% PEG	238,7 ± 32,3	70,3 ± 17,5		

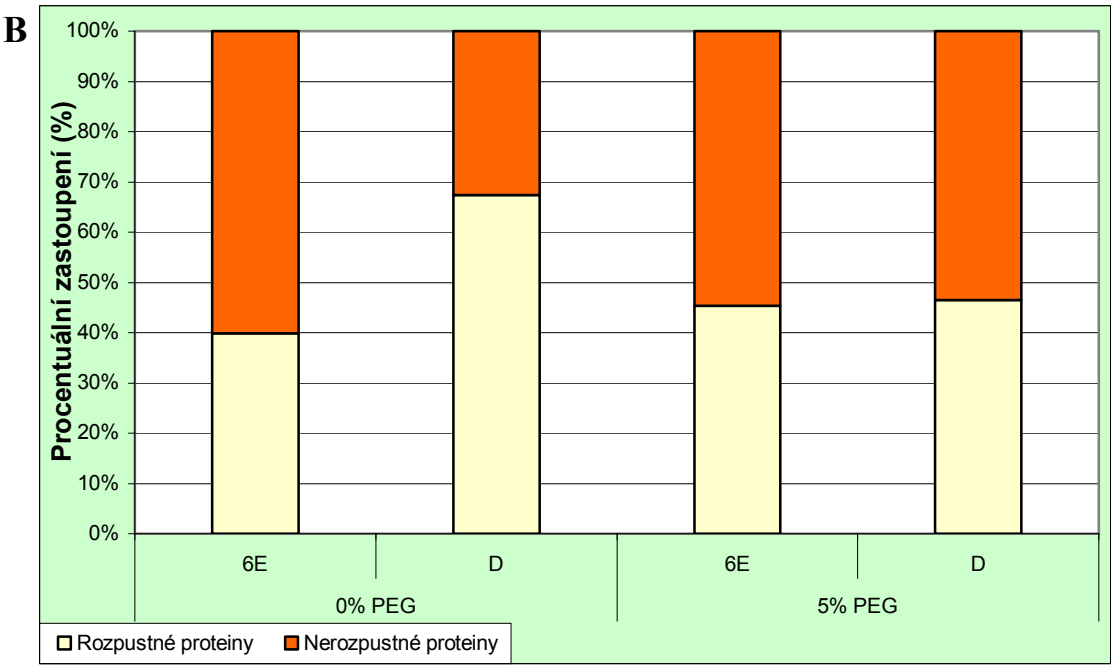
4.2.2. Obsah proteinů

Embrya zrající na maturačním médiu bez přítomnosti PEG (0%) obsahovala větší množství proteinů (µg/mg sušiny) na konci zrání, než embrya zrající na médiu s 5 % PEG (Graf 37). U varianty s 0% PEG došlo během desikace ke snížení obsahu nerozpustných proteinů, obsah rozpustných proteinů se nezměnil. U varianty s 5% PEG byl obsah rozpustných i nerozpustných proteinů stejný na konci zrání jako na konci desikace.

Graf 37: Obsah proteinů (µg/mg sušiny) na konci zrání a po desikaci somatických embryí *Picea abies*, embrya zrající na médiu s 0% a 5% PEG; A – obsah lipidů, B – procentuální zastoupení rozpustných a nerozpustných proteinů v sušině; 6E – izolovaná embrya na konci zrání; D – embrya po desikaci. Průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 3 až 5. Odlišná písmena nad sloupci (a, b, c) označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



Varianta	Obsah proteinů [µg/mg sušiny]	
	6E	D
0% PEG	152,00 ± 29,52	92,65 ± 25,60
5% PEG	42,90 ± 9,61	42,18 ± 8,98



5. Diskuze

Somatická embrya se vyvíjejí bez podpory mateřského pletiva megagametofytu. Vývoj somatického embrya a jeho regulace jsou tedy plně závislé na látkách přijímaných z kultivačního média a na kultivačních podmínkách. Sacharidová složka kultivačních médií významným způsobem ovlivňuje průběh somatické embryogeneze jehličnanů. Je důležité, jakým sacharidem a v jaké koncentraci je kultura zásobena (např. Tremblay a Tremblay, 1991; Nørgaard, 1997; Taber a kol., 1998; Iraqi a Tremblay, 2001a). Vhodně zvolený typ a množství dostupného sacharidu slouží především jako dobře utilizovatelný zdroj energie a uhlíku a podporuje embryogenní kulturu ve zdárném vývoji (Lipavská a Konrádová, 2004). Zvýšená koncentrace sacharidů v médiu však nemusí mít vždy pozitivní vliv (Hakman a von Arnold, 1988; Tremblay a Tremblay, 1991). Přítomnost sacharidu v médiu a to v míře, která závisí jak na jeho množství, tak na jeho typu také ovlivňuje osmotický potenciál média (např. Tremblay a Tremblay, 1991). Některé publikace poukazují také na možnost, že sacharidová složka médií může mít signální funkci (Iraqi a Tremblay, 2001a, b).

5.1. Analýza tekutých maturačních médií během zrání somatických embryí

Obsah sacharidů v médiu není v průběhu subkultivačního intervalu stálý a může se od výchozího stavu výrazně lišit. Jak zjistil ve své práci Kubeš (2004), při zrání SE *Picea abies* na médiu se 3% sacharózou dochází během týdenního subkultivačního intervalu k hydrolýze sacharózy na glukózu a fruktózu, a to do té míry, že na konci týdne se sacharóza v médiu již nenachází. Představa, že kultura pěstovaná na médiu s 3% sacharózou a týdenním subkultivačním intervalem zraje v prostředí s trvale dostupnou sacharózu je tedy mylná. Tremblay a Tremblay (1995) prokázali při kultivaci embryogenní kultury *Picea mariana*, že k hydrolýze sacharózy dochází pouze v přítomnosti embryogenní kultury a navrhli, že k hydrolýze dochází působením extracelulárních enzymů, vylučovaných embryogenní kulturou do kultivačního média. Iraqi a kol. (2005) potvrdili přítomnost invertázy v kultivačním médiu.

Při analýze tekutého maturačního média na konci týdenního subkultivačního intervalu varianty S se kompletní hydrolýza sacharózy potvrdila (Grafy 13, 14, 15).

Maturační médium po týdnu kultivace s embryogenní kulturou *Picea abies* AFO 541 obsahovalo pouze glukózu a fruktózu. Při analýze tekutého maturačního média variant S (Grafy 13, 14, 15) a G+F (Grafy 16, 17, 18) byla zaznamenána na konci týdenních subkultivačních intervalů změna v zastoupení glukózy a fruktózy. Na konci prvních třech týdnů zrání byly glukóza a fruktóza v médiu zastoupeny rovnoměrně, v posledních třech týdnech se poměr mírně měnil ve prospěch fruktózy. Exogenní sacharidy jsou během kultivace přijímány embryogenní kulturou a dále metabolizovány. Preference v příjmu jednotlivých sacharidů z média je druhově specifická (Tautorus a kol., 1992, 1994). Například u druhu *Pseudotsuga menziesii* převažuje příjem fruktózy z média nad glukózou (Taber a kol., 1998). Dosažené výsledky dokazují, že v případě *Picea abies* linie AFO 541 převažuje příjem glukózy nad fruktózou. Preferenční příjem glukózy si lze vysvětlit, její důležitou rolí v růstových a vývojových procesech, slouží jako zdroj pro syntézu škrobu a sacharózy (Lipavská a kol. 2000b).

Analýzou maturačního média experimentální varianty S↑ jsem testovala do jaké míry dochází k hydrolýze sacharózy kulturou zásobenou třikrát týdně médiem se 3 % sacharózy a zda tedy zrání kultury probíhá po celou dobu v přítomnosti sacharózy. Iraqi a Tremblay (2001a) zjistili, že po přenosu embryogenní kultury *Picea glauca* a *Picea mariana* z proliferačního média (1 % sacharózy) na maturační médium s vyšším obsahem sacharózy (6 %) došlo k prudkému vzrůstu aktivity endogenních invertáz. Zvýšené zásobení sacharózou u varianty S↑ mohlo indukovat ve větší míře enzymy degradující sacharózu (sacharózasyntáza, invertáza), a v médiu by pak byly přítomny pouze hexózy i při častějším přenosu na čerstvé médium. K takové situaci nedošlo. Během dvoudenního intervalu došlo k částečné hydrolýze sacharózy, ale po celou dobu zrání SE byla sacharóza v médiu přítomna (Graf 19, 20, 21).

5.2. Výtěžky zralých somatických embryí

Změna v dostupnosti různých typů sacharidů vede k rozdílným výtěžkům somatických embryí. Kubeš (2004) pozoroval nižší výtěžky zralých SE *Picea abies* na médiu s glukózou (1,57%) a fruktózou (1,57%), než na médiu se sacharózou (3%). Mé výsledky toto zjištění potvrzují. Ve všech třech opakováních experimentu byly zaznamenány vyšší výtěžky zralých SE u varianty S (3% sacharóza) než u varianty G+F (1,57% glukóza + 1,57% fruktóza) (Grafy 31, 32, 33). Přesto, že o statisticky průkazný rozdíl se jednalo pouze v druhém opakování (Graf 32), tato tendence se

projevovala i v ostatních opakováních pokusu. Podobné výsledky získali i jiní autoři. Například Iraqi a Tremblay (2001b) získali vyšší počet zralých SE *Picea mariana* a *Picea glauca* na médiu se sacharózou než na médiu s glukózou a fruktózou. U druhu *Pseudotsuga menziesii* vedlo také nahrazení sacharózy kombinací glukózy a fruktózy v médiu ke snížení výtěžků zralých SE (Taber a kol., 1998). Otázkou však zůstává, co je příčinou těchto pozorovaných rozdílů ve výtěžcích.

Iraqi a Tremblay (2001b) ve své práci studovali roli sacharózy při zrání SE *Picea mariana* a *Picea glauca.* Zjistili, že na médiu obsahujícím 6 % sacharózy, která během období zrání hydrolyzovala na glukózu a fruktózu byly výtěžky embryí výrazně vyšší, než na médiu se 6 % sacharózy, kde zabránili hydrolýze denním přenosem na čerstvé médium. Pokusila jsem se ověřit tento výsledek pro embryogenní kulturu *Picea abies*. Přenosem embryogenní kultury třikrát týdně na čerstvé médium se 3% sacharózou (varianta S↑) jsem se pokusila zabránit úplné hydrolýze sacharózy v médiu. Jak potvrzují výsledky analýzy média v průběhu zrání, tak se tímto uspořádáním podařilo hydrolýzu sacharózy omezit a po celou dobu zrání SE byla sacharóza v médiu přítomna (Grafy 19, 20, 21). Výtěžky SE byly nižší u přenášené varianty S↑ než u nepřenášené varianty S, avšak rozdíl byl statisticky průkazný pouze v prvním opakování experimentu. V ostatních opakováních nebyl rozdíl výrazný. Významný rozdíl ve výtěžcích zralých SE mezi variantou S (hydrolýza sacharózy) a variantou S↑ (omezení hydrolýzy sacharózy v médiu), který popisují Iraqi a Tremblay (2001b) se tedy nepotvrdil. Vzhledem k tomu, že v experimentu autorů Iraqi a Tremblay (2001b) nedošlo ke zvýšení výtěžku zralých SE ani při zrání kultury na médiích s různými koncentracemi glukózy a fruktózy, autoři předpokládají, že hexózy přijaté přímo z média nepodporují vývoj embryí tak dobře jako hexózy vzniklé hydrolýzou sacharózy v médiu. Vyslovují hypotézu, že štěpení sacharózy v médiu na glukózu a fruktózu vytváří signál, podporující zdárné zrání somatických embryí. Tento závěr nelze v současné době popřít, avšak některé sporné body této studie vyžadují další objasnění. Každodenním přenosem embryogenní kultury na čerstvé médium dochází nejen ke změnám v dostupnosti sacharidů, ale i jiných složek média jako je ABA, organické doplňky a minerální živiny. ABA je nejdůležitějším růstovým regulátorem v období zrání SE. Denní přenos na čerstvé médium se může promítnout ve zvýšení endogenní hladiny ABA, a to může mít nepříznivý vliv na vývoj embrya (Lipavská a Konrádová, 2004). Negativní vliv může mít ovšem i změna v obsahu dalších látek, ke které dochází v důsledku každodenního přenosu na čerstvém médium. Ve svém experimentu jsem

proto zavedla kontrolní variantu G+F↑. U této varianty jsem přenosem kultury třikrát týdně na čerstvé médium se snižujícím se obsahem sacharózy simulovala snižující se obsah sacharózy v médiu během týdenního subkultivačního intervalu, ke kterému dochází při kultivaci standardním způsobem (jako u varianty S). Zároveň ostatní složky kultivačního média (ABA, organické doplňky, minerální látky) byly u této varianty dodávány s čerstvým médiem třikrát týdně (jako u varianty S↑). Výtěžky byly u této varianty nejnižší ve všech opakování experimentu. Dostupnost sacharózy, glukózy a fruktózy byla pro somatická embrya varianty G+F↑ a varianty S obdobná. Přesto byly výtěžky těchto variant rozdílné (Grafy 31, 32, 33). U varianty G+F↑ byly výtěžky nižší, než u varianty S (v prvním a druhém opakování byly rozdíly statisticky průkazné). Snížení výtěžků u varianty G+F↑ lze přičíst vlivu častého přenášení a s ním spojeným změnám v kultivačním médiu. Například změnám v pH média (viz kapitola 5.3).

5.3. Změny pH maturačního média během zrání somatických embryí *Picea abies*

Zkrácením subkultivačního intervalu a častějším dodáváním čerstvého média nedochází ke změnám pouze v dostupnosti sacharidů, ABA, minerálních látek a organických doplňků. Mění se i jiné parametry kultivačního média, jedním z nich je pH.

Dynamika pH maturačního média během zrání SE byla obdobná u všech experimentálních variant. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v prvním a šestém týdnu zrání. Nejnižší hodnoty pH byly ve třetím a čtvrtém týdnu zrání. Zjištěné změny v hodnotách pH maturačního média mohou souviset s vývojovými a metabolickými změnami embryonální kultury. Ve třetím týdnu zrání (prekotyledonární embryo) dochází k odumírání suspenzoru, začíná histodiferenciace, na bázi se utváří kořenová čepička a ve střední části embrya se vytváří základy prokambia. Ve čtvrtém týdnu se zakládají dělohy (Svobodová a kol., 1999). Tyto významné metabolické a strukturální změny se mohou promítnout i ve výraznějším snížení pH média ve třetím a čtvrtém týdnu kultivace. Filonova a kol. (2000) zjistili, že během formování SE v ESM *Picea abies* má svou přirozenou roli programovaná buněčná smrt některých buněk kultury, například jsou tímto způsobem degradovány buňky suspenzoru. Tento proces je spojen s poklesem pH kultivačního média.

Pullman a kol. (2005) sledovali změny pH média v embryonální suspenzní kultuře *Pinus taeda* v průběhu jednoho prodlouženého subkultivačního intervalu (16-19 dní).

Zjistili, že od prvního do pátého dne kultivace dochází k poklesu pH a od pátého dne do dvanáctého dne kultivace k opětovnému zvýšení pH. Autoři dávají tuto dynamiku do souvislosti s počáteční utilizací amonného iontu z média, při které dochází ke snížení pH a s příjmem dusičnanu v následných dnech, při kterém dochází naopak ke zvyšování pH (Lulsdorf a kol., 1992).

U variant S a G+F se subkultivačním intervalem 1 týden, byly minimální hodnoty pH maturačního média nižší, než u variant S↑ a G+F↑ se zkráceným subkultivačním intervalem na 2 a 3 dny. Zkrácením subkultivačního intervalu tedy došlo k zabránění poklesu pH na nižší hodnoty. Bozkov a kol. (2002b) zabránili acidifikaci média spojenou s programovanou buněčnou smrtí pufrováním média a sledovali vliv na vývoj SE *Picea abies*. Došlo k inhibici programované buněčné smrti a výtěžek zralých somatických embryí byl nižší.

5.4. Dynamika obsahu endogenních nestrukturních sacharidů v ESM a somatických embryích během proliferace, zrání a klíčení

Dynamika obsahu endogenních nestrukturních sacharidů v průběhu zrání a klíčení byla obdobná u všech experimentálních variant (Grafy 1 až 12). V průběhu zrání obsahovala ESM především glukózu, fruktózu a v nejmenším množství sacharózu. Somatická embrya obsahovala nižší obsah celkových sacharidů než ESM a spektrum tvořila především sacharóza a v menším zastoupení hexózy. Obdobnou dynamiku endogenních sacharidů pozorovali u SE *Picea abies* Lipavská a kol. (2000b) a u SE *Picea mariana* a *Picea glauca* Iraqi a Tremblay (2001a).

Na konci 6. týdne zrání obsahovala SE všech variant ve svém spektru sacharidů přes 60 % sacharózy. Sacharózu hromadila i somatická embrya rostoucí na médiu pouze s glukózou a fruktózou (Grafy 4, 5, 6), tedy bez přítomnosti sacharózy. Tento výsledek je v souladu se zjištěním autorů Iraqi a Tremblay (2001b), že obsah glukózy, fruktózy, sacharózy a škrobu ve zralých SE *Picea mariana* a *Picea glauca* je nezávislý na typu sacharidu přítomném v maturačním médiu. Tento výsledek také podporuje hypotézu, že během zrání SE dochází k resyntéze sacharózy (Lipavská a Konrádová, 2004).

U všech experimentálních variant došlo během desikace k výraznému snížení celkového obsahu sacharidů, snížení obsahu sacharózy a ve spektru se objevily

sacharidy rafinózové řady (RFO). Jiný výsledek pozorovali Bomal a kol. (2002) u SE *Picea mariana.* SE také obsahovala rafinózu, ale obsah sacharózy se po 48 hodinách desikace ztrojnásobil. Sacharóza vznikla pravděpodobně mobilizací zásobního škrobu, jehož obsah během desikace klesl. U genotypu *Picea abies* zralá SE vykazují nízký obsah škrobu a jeho mobilizace se ve zvýšení obsahu sacharózy během desikace výrazně nepromítne (Lipavská a kol., 2000b). Pokrytí energetických nároků během desikace je u *Picea abies* pravděpodobně zajištěno mobilizací jiných látek pravděpodobně lipidů (kapitola 5.5.1). Akumulace RFO byla zjištěna i u zygotických embryí v pozdních fázích embryogeneze (Gösslová a kol., 2001). Během desikace, stejně jako v semenech v období dehydratace, jsou embrya vystavena snížené dostupnosti vody a RFO plní v tomto období ochrannou funkci (Caffrey a kol., 1988). Během prvních dnů klíčení dochází k degradaci RFO. V tomto období jsou zřejmě zdrojem uhlíku a energie (Downie a Bewley, 2000).

5.5. Obsah zásobních látek

Množství zásobních látek, které embryo během zrání nasyntetizuje, hraje klíčovou roli v dalších fázích vývoje a je dobrým ukazatelem kvality zralého somatického embrya (Attree a Fowke, 1991).

5.5.1. Lipidy

Lipidy patří mezi hlavní zásobní látky jehličnanů (např. Feirer a kol., 1989, Stone a Gifford, 1999). Množství a složení lipidů nahromaděných během zrání SE může sloužit jako ukazatel kvality a klíčivosti somatických embryí. Nedostatečný obsah lipidů v somatických embryích může mít záporný vliv na další vývoj a klíčení (Feirer a kol., 1989). Manipulací s kultivačními podmínkami během zrání somatických embryí lze obsah zásobních lipidů v somatických embryích ovlivnit. Ve své práci jsem zjišťovala, jak se různá dostupnost sacharidů během zrání SE promítne v obsahu lipidů ve zralých SE *Picea abies*. U SE rodu *Picea* lze kladně ovlivnit akumulaci zásobních lipidů přítomností ABA a PEG v maturačním médiu (Hakman a von Arnold, 1988; Feirer a kol., 1989; Attree a kol., 1992).

Různé zásobení embryonální kultury *Picea abies* sacharidy nemělo na obsah lipidů vliv. Somatická embrya všech experimentálních variant obsahovala na konci zrání přibližně stejné množství lipidů. Mezi variantami nebyl prokázán statistický rozdíl (Graf

34). Přenášené varianty S↑ a G+F↑ jsou vystaveny vyšší a zároveň stabilnější koncentraci ABA, oproti nepřenášeným variantám. Tento rozdíl však neměl vliv na ukládání zásobních lipidů.

K utilizaci lipidů dochází v období se sníženou dostupností živin. U varianty S↑ a G+F↑ byl zjištěn výrazný pokles v obsahu lipidů po desikaci. Během desikace nemají somatická embrya žádný exogenní zdroj energie a lipidy slouží jako zdroj energie. Po týdnu klíčení desikovaných SE na germinačním médiu se sacharózou (1%) došlo ke zvýšení obsahu lipidů.

U nepřenášených variant S a G+F v tomto experimentu nebyl obsah lipidů po desikaci stanoven. Avšak Kubeš a Skala (osobní sdělení) pozorovali snížení obsahu lipidů po desikaci u SE *Picea abies* i při kultivaci standardním způsobem na sacharóze (3%) a s týdenním subkultivačním intervalem.

5.5.2. Proteiny

Zygotická i somatická embrya akumulují zásobní proteiny během zrání (Hakman a kol., 1990; Misra a kol., 1993). Obsah proteinů ve zralých somatických embryích *Picea glauca* lze kladně ovlivnit ošetřením kultury ABA a PEG během zrání (Misra a kol., 1993). Zvýšený obsah zásobních proteinů ve zralých SE *Picea mariana* byl pozorován také při kultivaci na médiu se zvýšenou koncentrací sacharózy (6 %). Se snižující se koncentrací sacharózy v médiu, klesal i obsah rozpustných a nerozpustných proteinů v embryích (Iraqi a kol., 2005). Také embrya *Pinus strobus* zrající na maturačním médiu se 6 % sacharózy obsahovala více zásobních proteinů než na médiu se 3 % sacharózy (Klimaszewska a kol., 2004). V mé práci se rozdílná forma dostupných sacharidů během zrání SE *Picea abies* v obsahu proteinů nepromítla (Graf 35). Obsah proteinů na konci zrání byl u všech experimentálních variant bez statisticky průkazného rozdílu.

Výsledek autorů Iraqi a Tremblay (2001a) poukazuje na to, že obsah rozpustných a nerozpustných proteinů v SE *Picea mariana* a *Picea glauca* je závislý na zdroji sacharidů v médiu. Vyšší obsah proteinů pozorovali u SE zrajících na 6% sacharóze, která během zrání hydrolyzovala na glukózu a fruktózu, než u SE zrající na 6% sacharóze, kde hydrolýze zabránili. Autoři si tento výsledek vysvětlují tak, že hydrolýza sacharózy v médiu slouží jako signál, který zvyšuje expresy genů pro zásobní proteiny.

V mé práci se tento výsledek nepotvrdil, SE varianty S (hydrolýza sacharózy) obsahovala přibližně stejné množství proteinů jako SE varianty S↑ (omezení hydrolýzy sacharózy) (Graf 35).

U zygotických embryí krytosemenných rostlin dochází při přirozené dehydrataci semen k přerušení exprese genů pro zásobní proteiny, jejich obsah se dále nezvyšuje (Misra, 1994). Obsah proteinů SE *Picea glauca* byl shodný před desikací jako po desikaci (Misra a kol, 1993). V mé práci se obsah proteinů v průběhu desikace SE také nezměnil (Graf 35).

5.6. Vliv osmotického stresu na obsah zásobních látek

V předchozích studiích bylo zjištěno, že snížení osmotického potenciálu maturačního média podporuje a synchronizuje proces zrání somatických embryí, inhibuje předčasné klíčení a navozuje toleranci k desikaci (Attree a Fowke, 1993). PEG je vysokomolekulární nepenetující osmotikum, které vytváří v maturačním médiu trvalý osmotický stres, podobný přirozenému stresu z nedostatku vody, jemuž jsou vystavena zygotická embrya v semenech (Attree a kol., 1991; Attree a Fowke, 1993). Jedním z pozitivních vlivů PEG v maturačním médiu je podle některých studií i zvýšená akumulace zásobních látek v SE (např. Attree a kol., 1991). Misra a kol. (1993) ve své práci uvádějí, že aplikace PEG během zrání SE *Picea glauca* vedla ke zvýšení obsahu zásobních proteinů v SE. Attree a kol. (1995) popsal pozitivní vliv PEG na ukládání lipidů.

Porovnávala jsem obsah zásobních proteinů a lipidů v SE *Picea abies* zrajících na maturačním médiu s 5% PEG, s kontrolní variantou SE zrající na médiu bez PEG. Překvapivě, embrya ošetřená PEG obsahovala nižší množství zásobních proteinů, než varianta neošetřená PEG (Graf 37). Tyto výsledky nejsou v souladu s dosavadními poznatky o vlivu PEG v maturačním médiu na zrání SE *Picea abies*. Například Gorbatenko a Hakman (2001) zjistili, že SE *Picea abies* zrající za přítomnosti 7,5% PEG zásobní proteiny akumulovala v hojné míře. Vzhledem k tomu, že jsem tento experiment provedla bez opakování, dosažený výsledek je pouze orientační a bylo by vhodné daný experiment několikrát zopakovat.

Pozitivní vliv PEG na akumulaci lipidů se podařilo potvrdit. Při kultivaci za přítomnosti 5% PEG obsahovala SE vyšší množství lipidů, než kontolní varianta bez PEG (Graf 36). Během desikace pak došlo ke snížení obsahu lipidů asi o 70% u obou

variant. Během desikace byla tedy využita přibližně stejná část naakumulovaných lipidů u obou variant. Po přesazení SE na germinační médium se sacharózou (1%) došlo k opětovnému nárůstu obsahu lipidů.

Výsledky této práce ukazují, že rozdílé zásobení sacharidy embryogenní kultury *Picea abies* linie AFO 541 má vliv na zrání somatických embryí. Otázkou stále zůstává, která z funkcí sacharidů se na tom podílí nejvýznamněji. Některé zjištěné výsledky pro druh *Picea abies* nejsou shodné s publikovanými výsledky pro jiné druhy tohoto rodu a tím ukazují nutnost odděleného přístupu k jednotlivým genotypům, protože i příslušníci jednoho rodu různých druhů vykazují odlišné nároky na kultivační podmínky. Nelze tedy zobecňovat výsledky získané na jednom genotypu.

6. Závěry

- **Hypotéza 1 potvrzena**
  - Nahrazením 3% sacharózy v maturačním médiu ekvimolárním množstvím glukózy a fruktózy vedlo ke snížení výtěžků SE.
  - Zkrácení subkultivačního intervalu vedlo ke snížení výtěžků zralých somatických embryí.
  - Omezení kompletní hydrolýzy sacharózy v maturačním médiu zkrácením subkultivačního intervalu vedlo k částečnému snížení výtěžků SE.

- **Hypotéza 2 zamítnuta**
  - Změny v obsahu a spektru endogenních nestrukturních sacharidů v průběhu zrání byly v základních rysech podobné u všech experimentálních variant.
  - U všech variant (včetně varianty pěstované na médiu s hexózami) docházelo během zrání k poklesu obsahu celkových sacharidů, a změně poměru sacharózy k hexózám ve prospěch sacharózy.

- **Hypotéza 3 potvrzena**
  - U všech experimentálních variant byla zjištěna během šesti týdnů zrání podobná dynamika pH maturačního média, s minimálními hodnotami zjištěnými ve fázi zakládání děloh
  - Hodnota pH média byla ovlivněna zkrácením subkultivačního intervalu.

- **Hypotéza 4 zamítnuta**
  - Obsah proteinů a obsah lipidů ve zralých SE nebyly ovlivněny různým množstvím a typem sacharidů v maturačním médiu.

- **Hypotéza 5 potvrzena**
  - Snížení osmotického potenciálu média vedlo ke zvýšení obsahu lipidů ve zralých SE *Picea abies*.

Výsledky diplomové práce byly prezentovány formou plakátového sdělění:

Lipavská H., Kubeš M., Drážná N.: Somatic embryogenesis in conifers: storage compound dynamics, 6th international symposium Recent advances in plant biotechnology From laboratory to bussiness. September 12-16, p.119, 2005.

7. Seznam použité literatury

Attree S.M., Fowke L.C.: Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. – Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and micropropagation 17: 53-70; 1991

Attree S.M., Fowke L.C.: Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 1-35; 1993

Attree S.M., Moore D., Sawhney V.K., Fowke L.C.: Enhanced maturation and dessication tolerance of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) somatic embryos: effects of a non-plazmolyzing water stress and abscisic acid. – Ann.Bot. 68: 519-525; 1991

Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C.: Manipulation of conditions for the culture of somatic embryo of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. – Planta 187: 395-404; 1992

Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C.: Production of vigorous, dessication tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. – Plant Cell Reports 13: 601-606; 1994

Attree S.M., Pomeroy M.K., Fowke L.C.: Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss.) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. – Journal of Experimental Botany 46 (285): 433-439; 1995

Avijoglu A., Knox R.B.: Storage lipid accumulation by zygotic and somatic embryos in culture. – Ann. Bot. 63: 409-420; 1989

Barrett J.D., Park Y.S., Bonga J.M.: The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench.) Voss.] somatic embryogenesis. – Plant Cell Reports 16: 411-415; 1997

Bomal P., Le V.Q., Tremblay F.M.: Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugar, and dehydrins. – Physiologia Plantarum 115: 523-530, 2002

Boulay M.P., Gupta P.K., Krogstrup P., Durzan D.J.: Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). – Plant Cell Reports 7: 134-137; 1988

Bozkov P.V., Ahn I.S., Parka Y.G.: Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. – Can. J. For. Res. 75: 509-512; 1997

Bozhkov P.V., Dyachok J., Filonova L.: Developmental pathways of somatic embryogenesis. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249; 2002a

Bozhkov P.V., Filonova L.H., von Arnold S.: A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. – Biotechnology and Bioengineering 77 (6): 658-667; 2002b

Bozhkov P.V., von Arnold S.: Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. – Physiologia Plantarum 104: 211-224; 1998

Caffrey M., Fonseca V., Leopold A.C.: Lipid-sugar interaction – relevance to anhydrous biology. – Plant Physiol. 86: 754-758; 1988

de Jong A.J., Cordewener J., Lo Shiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., van Kammen A. & de Vries S.C.: A *Daucus carrota* somatic embryo mutant is rescued by chitinase. – Plant Cell 4: 425-433; 1992

Downie B., Bewley D.: Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. – Physiologia Plantarum 110: 1-12; 2000

Dure L.III., Crouch M., Harada J., Ho T.D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z.R.: Comon amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. – Plant Molecular Biology 12: 475-486; 1989

Duta P.C., Appelqvist L.A.: The effects of cultural conditions on the accumulation of deposit lipids notably petroselinic acid during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. – Plant.Sci. 64: 167-177; 1989

Dyachok J.V., Wiweger M., Kenne L., Von Arnold S.: Endogenous nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. – Plant Physiology 128: 523-533; 2002

Egertsdotter U., Mo L.H., von Arnold S.: Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). – Physiologia Plantarum 88: 315-321; 1993

Egertsdotter U., von Arnold S.: Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). – Physiologia Plantarum 93: 334-345; 1995

Feirer R.P., Conkey J.H., Verhagen S.A.: Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. – Plant Cell Reports 8: 207-209; 1989

Filonova L.H., Bozhkov P.V., Brukhin V.B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S.: Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. – Journal of Cell Science 113: 4399-4411; 2000

Fu H., Park W.D.: Sink and vascular associated sucrose synthase function are encoded by different gene classes in potato. – Plant Cell 7: 1369-1385; 1995 – citováno podle Halford N.G., Purcell P.C., Hardie G.: Is hexokinase really a sugar sensor in plants? – Trends in Plant Science 4: 117-120; 1999

Galerne M., Bercetche J., Dereuddre J.: Cryoconservation of embryogenic callus of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) – influence of different factors on callus recovery and on embryo and plant production. – Bulletin de la Societe Botanique de France – Lettres Botaniques. 139 (4-5): 331-344; 1992

Gibson S.I.: Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. – Journal of Experimental Botany 55: 253-264; 2004

Gifford D.J.: An electrophoretic analysis of the seed protein from *Pinus monticola* and eight other species of pine. – Can.J.Bot 66: 1808-1812; 1988

Godt D.E., Riegel A., Roitsch T.: Regulation of sucrose synthase expession in *Chenopodium rubrum*: charakterization of sugar induced expression in plants. – Plant Physiol. 146: 231-238; 1995

Gorbatenko I., Hakman I.: Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. – Int. J. Plant Sci. 162: 1211-1218; 2001

Gösslová M., Svobodová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.: Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo maturation. – In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 37(1): 24-28; 2001

Grigová M.: Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): Studium dynamiky vybraných zásobních látek (Diplomová práce). PřF UK, Praha, 2003.

Gupta P.K., Durman D.J.: Somatic polyembryogenesis from cyklus of mature sugar pine embryo. – BioTechnology 4: 643-64; 1986

Gupta P.K., Grob J.A.: Somatic embryogenesis in conifers. – In: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 1: 81-98, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1995

Gutmann M., von Anderkas P., Label P., Lelu M.-A.: Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. – Journal of Experimental Botany 47(305): 1905-1917; 1996

Hakman I.: Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. – Physiologia Plantarum 87: 148-159; 1993

Hakman I., Stabel P., Engerstrom P., Eriksson T.: Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). – Physiologia Plantarum 80: 441-5; 1990

Hakman I., von Arnold S.: Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). – Journal of Plant Physiology 121: 149-158; 1985

Hakman I., von Arnold S.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). – Physiologia Plantarum 72: 579-587; 1988

HilgarthC., Sauer N., Tanner W.: Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Chlorella*. - J.Biol.Chem. 266: 24044-47; 1991 – citováno podle Smeekens S.: Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 49-81; 2000

Chalupa V.: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae 14: 57-63, 1985

Iraqi D., Tremblay F.M.: Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. – Journal of Experimental Botany 52 (365): 2301-2311; 2001a

Iraqi D., Tremblay F.M.: The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*). – Physiologia Plantarum 111: 381-388; 2001b

Iraqi D., Van Aut Le, Lamhamedi M.S., Tremblay M.F.: Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. – J. Plant Physiol. 162: 115-124; 2005

Jang J.C., Sheen J.: Sugar sensing in higher plants. – Plant Cell 6: 1665-1679; 1994

Jang J.C., Sheen J.: Sugar sensing in higher plants. – Trends Plant Sci. 2: 169-174; 1997

Joy R., W., Yeung E.C., Kong L., Thorpe T.A.: Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. – In Vitro Cell. Dev. Biol. 27: 32-41; 1991

Kartha K.K., Fowke L.C., Leung N.L., Caswell K.L., Hakman I.: Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). – J. Plant Physiol. 132: 529-539; 1988

Khlifi S., Tremblay F.M.: Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine in the number and germinability of somatic embryos. – Plant Cell Tissue and Organ Culture 41: 23-32; 1995

Kim Y.H., Janick J.: Abscisic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. – Plant Cell Tissue and Organ Culture 24: 83-89; 1991

Klimaszewska K., Morency F., Jones-Overton C., Cooke J.: Accumulation pattern and identification of seed storage protein in zygotic of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. – Physiologia Plantarum 121: 682-690; 2004

Koch K.E.: Carbohydrate-modulated gene expression in plants. – Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47: 509-540; 1996

Kong L., Attree S.M., Fowke L.C.: Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. – Physiologia Plantarim 101: 23-30;1997

Kong L., Attree S.M., Fowke L.C.: Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). – Plant Science 133: 211-220; 1998

Kong L., Yeung E.C.: Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. – Physiologia Plantarum 93: 298-304; 1995

Konrádová H., Grigová M., Lipavská H.: Cold-induced accumulation of raffinose oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). – In Vitro Cellular and Developmental Biology. 425-427, 2003

Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.: Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenese in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzymes activities. – J. Plant Physiol. 159: 387-396; 2002

Koster K.L., Leopold A.L.: Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. – Plant Physiol. 88: 829-832; 1988

Kubeš M.: Vliv aplikace exogenních sacharidů na proces somatické embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) (Diplomová práce). PřF UK, Praha, 2004

Kumstýřová L., Vágner M., Lipavská H., Gösslová M.: Somatic embryogenesis of Norway spruce: anatomical charakterization and content of non-structural saccharides. – Plant Physiol. Biochem. 38 (Suppl.)-43; 2000

Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B., Ward J.M.: The dual function of sugar carriers: Transport sugar sensing. – The Plant Cell 11: 707-726; 1999

Lipavská H., Konrádová H.: Invited Review: Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. – In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 40: 23-30; 2004

Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J.: Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. – J. Plant Physiol. 157: 365-373; 2000a

Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Vágner M., Vondráková Z.: Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. – In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 36: 260-267; 2000b

Lulsdorf M.M., Tautorus T.E., Kikcio S.I., Dunstan D.I.: Growth parametres of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). – Plant Science 82:227-234; 1992

Majewska-Sawka A. & Nothagel E.A.: The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. – Plant Physiol. 123: 3-9; 2000

Misra S.: Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination: Biochemical and molecular advances. – Seed Science Research 4: 357-384; 1994

Misra S., Atree S.M., Leal I., Fowke L.C.: Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. – Annals of Botany 71: 11-22; 1993

Misra S., Green M.J.: Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. I. Seed proteins and protein body composition of mature embryo and the megagametofyt of white spruce (*Picea glauca*[Moench.] Voss). – Plant Science 68: 163-173; 1990

Nagmani R., Bonga J. M.: Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. – Can. J. For. Res. 15: 1088-1091; 1985

Nørgaard V.J.: Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. – Plant Science 124: 211-221; 1997

Nørgaard J.V., Krogstrup P.: Somatic embryogenesis in *Abies spp*. – In: Jain S, Gupta P., Newton R. (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 3: 341-355; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1995

Obendorf R.L.: Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed dessication tolerance. – Seed Sci. Res. 7: 63-74; 1997

Özcan S., Dover J., Johnson M.: Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. - EMBO J. 17: 2566-73; 1998 – citováno podle Smeekens S.: Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 49-81; 2000

Pâques M., Berceteche J., Palada M.: Prospects and limits of somatic embryogenesis of *Picea abies*. – In: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 1: 399-414; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands 1995

Pence V.C., Hasegawa P.M., Janick J.: Sucrose mediated regulation of fatty acid compositin in asexual embryos of *Theobroma cacao*. – Physiologia Plantarum 53: 378-384; 1981

Pullman G.S., Johnson S., Van Tassel S., Zhang Y.: Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 91-103; 2005

Reid D.A., Lott J.N.A., Attree S.M., Fowke L.C.: Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos. I. phosphorus, phytic acid, potassium, magnesium, calcium, iron and zinc. – Plant Science 141: 11-18; 1999a

Reid D.A., Lott J.N.A., Attree S.M., Fowke L.C.: Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos; II. EDX analysis of globoids and Fe-rich particles. – Plant Science 141: 19-27; 1999b

Reinert J.: Morphogenese und ihre kontrolle an gewebekulturen aus carroten. Naturwissen. 45: 344-345, 1958

Roberts D.R.: Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. – Physiologia Plantarum 83: 247-254; 1991

Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T., Webster W.F., Sutton B.C.S.: Charakterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. – Plant Cell Rep. 8: 285-288; 1989

Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T., Webster W.F., Sutton B.C.S.: Abscis acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. – Physiologia Plantarum 78: 355-360; 1990

Roberts D.R., Lazaroff W.R., Webster F.B.: Interaction between maturation and high relative humidity treatmennts and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. – J. Plant Physiol. 138: 1-6; 1991

Rolland F., Moore B., Sheen J.: Sugar sensing and signaling in plants. – The Plant Cell 14: 185-205; 2002

Rook F., Gerrits N., Korstee A., van Kamoe M., Borrias M., et al.: Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. – Plant J. 15, 253-263, 1998 citováno z Smeekens S.: Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 49-81; 2000

Ruaud J-N., Bercetche J., Paques M.: First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year old *Picea abies* plants. – Plant Cell Reports 11: 563-566; 1992

Salaj T., Matúšová R., Salaj J.: The effect of carbohydrates and polyethylene glycol on somatic embryo maturation in hybrid fir *Abies alba x Abies numidica*. – Acta Biologova Cracoviensia 46: 159-167; 2004

Sheen J., Zhou L., Jang J.C.: Sugars as signaling molecules. – Curr. Opi. Plant Biol. 2: 410-418; 1999

Schuller A., Reuther G.: Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. – Plant Cell Reports 12: 199-202; 1993

Skriver K., Mundy J.: Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. – The Plant Cell 2: 503-512; 1990

Smeekens S.: Sugar-induced signal transduction in plants. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 49-81; 2000

Smeekens S., Rook F.: Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. –Plant. Physiol. 115: 7-13; 1997

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P.: Changes in protein synthesis upon cytokinin-mediated adventitious bud induction and during seedling development in Norway spruce, *Picea abies*. – Plant Physiol. 92: 1174-1183; 1990

Stasolla C., Kong L.,Yeung E.C., Thorpe T.A.: Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. – In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38: 93-105; 2002

Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R.R.: The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. – Plant Physiology 131: 49-60; 2003a

Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R.R.: Transcript profiles of stress-related genes in developing white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos cultured with polyethylene glycol. – Plant Science 165: 719-729; 2003b

Stone S.L., Gifford D.J.: Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germinatiopn and early-seedling growth. I. Storage protein reserves. – International Journal of Plant Science 158(6): 727-737; 1997

Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z.: Somatic embryogenesi in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. – Plant Physiol. Biochem. 37(3): 209-221; 1999

Taber R.T., Zhang Ch., Hu W.: Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. – Can. J. Bot. 76: 863-871; 1998

Tautorus T.E., Lulsdorf M.M., Kikcio S.I., Dunstan D.I.: Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. (black spruce) and the species complex *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. – Appl. Microbil. Biotechnol. 38: 46-51; 1992

Tautorus T.E., Lulsdorf M.M., Kikcio S.I., Dunstan D.I.: Nutrient utilization during bioreactor culture, and maturation of somatic embryo cultures of *Picea mariana* and *Picea glauca-engelmannii*. – In Vitro Cell Dev. Biol. 30: 58-63; 1994

Tremblay L., Tremblay F.M.: Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and (*P. rubens* Sarg.) somatic embryo. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 95-103; 1991

Tremblay L., Tremblay F.M.: Maturation of black spruce somatic embryo: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42: 39-46; 1995

Trumbly R.J.: Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. – Mol. Microbiol. 6: 15-21; 1992

Ulrychová A.: Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): optimalizace podmínek zrání (Diplomová práce). PřF UK, Praha, 2004

Vágner M., Vondráková Z., Strnadová Z., Eder. J., Macháčková I.: Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. – Adv. Hort. Sci. 12: 11-18; 1998

Vodrážka Z.: Biochemie. – Academia, Praha, 1999

von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Nörgaard J.: Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). V: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers. 3: 17-36, 1995

von Arnold S., Hakman I.: Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). – J. Plant Physiol. Vol. 132. pp. 164-169; 1988

Vooková B., Kormuťák A.: Some features of somatic embryo maturation of Algerian Fir. – In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38: 549-551; 2002