

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN



ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY
AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY
LABORATOŘ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK



Somatická embryogeneze smrku ztepilého
(*Picea abies* (L.) Karst.)

(disertační práce)

Lucie Fischerová

Praha 2007

Školitel:
RNDr. Martin Vágner, CSc.

Konzultanti:
RNDr. Zuzana Vondráková, CSc.
Mgr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martina Vágnera CSc., s použitím citované literatury. Výsledky prezentované v práci jsem získala jednak vlastní experimentální prací, jednak spoluprací se spoluautory přiložených publikací. Souhlasím s půjčováním disertační práce pro studijní účely.

Lucie Fischerová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při vypracování předkládané práce, jmenovitě pak zejména:

Dr. Martinu Vágnerovi (Ústav experimentální botaniky, AVČR) za nadhled a trpělivost při vedení mé disertační práce, za dodání vzletnosti jejímu úvodu, za poskytnutí vynikajícího pracovního zázemí a volnosti v plánování experimentální práce a také za to, že mi ukázal, že nejen góly rozhodují o radosti ze hry.

Dr. Zuzaně Vondrákové (Ústav experimentální botaniky, AVČR) za pomoc s anatomickou částí mé disertační práce, za velkou pomoc s jejím sepsáním, za to, že na mě vždy měla čas a taky za to, že umí příjemně říkat i nepříjemné věci.

Jarce Špačkové (Ústav experimentální botaniky, AVČR) za zaučení do práce s rostlinnými kulturami *in vitro*, za neocenitelnou technickou pomoc a za nakažlivě čínorodý přístup ke všemu.

Mgr. Lukáši Fischerovi (Katedra fyziologie rostlin PřF UK) za zaučení do metod molekulární biologie a za trpělivost, se kterou čelil přívalu mých otázek.

Dr. Janě Opatrné (Ústav experimentální botaniky, AVČR) za zaučení do metod počítačové analýzy obrazu.

Dr. Ivaně Macháčkové (Ústav experimentální botaniky, AVČR) za vytvoření přátelského prostředí a za nesmírně lidský přístup ke všemu a všem.

Dr. Heleně Lipavské (Katedra fyziologie rostlin PřF UK) za přínosné a příjemné konzultace a za stanovení obsahu sacharidů v dodaných vzorcích.

Dr. Haně Svobodové (Katedra fyziologie rostlin PřF UK) za přínosnou a pohodovou spolupráci v průběhu anatomických analýz.

Všem ostatním nejmenovaným, jež mi poskytli cenné rady, pomoc či svůj čas k diskusím nad tématy předkládané práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegům ze spřátelených laboratoří za vytvoření atmosféry, která velkou měrou přispěla ke vzniku mé disertační práce. Také děkuji za mnohá povzbuzení, která přispěla k jejímu dokončení. Velký dík patří mému manželovi a synovi za to, že vím, co je v životě opravdu důležité.

Tato práce byla zaštitěna granty: 522/96/K186 (GAČR), COST OC 843.50 (MŠMT ČR), LN00A081 (MŠMT ČR) a B6038402 (GAAVČR).

SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4 dichlorphenoxyoctová
ABA	kyselina abscisová
BAP	benzylaminopurin
DMSO	dimethylsulfoxid
LCO	lipochitooligosaccharidy
MES	kyselina 2-(N-morpholino) ethansulfonová
PEG	polyethylenglykol
RFO	sacharidy rafinosové řady

Zkratky názvů proteinů:

ABI3	abscisic acid insensitive 3
ABI4	abscisic acid insensitive 4
ABI5	abscisic acid insensitive 5
LEA	late embryogenesis abundant proteins
PaHB1	<i>Picea abies</i> homeobox 1
PaVP1	<i>Picea abies</i> viviparous1
SCR	SCARECROW
VP1	viviparous1

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	3
SEZNAM ZKRATEK	4
OBSAH	5
1. ÚVOD.....	6
2. CÍLE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1. Somatická embryogeneze	10
3.2. Somatická embryogeneze jehličnanů	11
3.2.1. Zakládání (indukce) embryogenních kultur	11
3.2.2. Udržování (proliferační) embryogenních kultur	12
3.2.3. Zrání (maturace) somatických embryí	14
3.2.4. Desikace a klíčení somatických embryí	16
3.3. Vybrané kapitoly somatické embryogeneze jehličnanů	18
3.3.1. Vývoj somatických embryí	18
3.3.1.1. Vývoj zygotického embrya	18
3.3.1.2. Vlastní vznik somatických embryí	19
3.3.1.3. Rozdíly mezi embryogenními kulturami	21
3.3.2. Role ABA v somatické embryogenezi jehličnanů	23
4. DISKUZE	26
4.1. Indukce a proliferace embryogenních kultur	26
4.2. Maturace embryogenních kultur	27
4.3. Desikace a klíčení	32
5. ZÁVĚRY.....	34
6. SEZNAM LITERATURY	36
7. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH	44

Příložené publikace:

Svobodová H., Albrechtová J., **Kumstýřová L.**, Lipavská H., Vágner M. a Vondráková Z. (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 209-221

Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J., **Kumstýřová L.**, Vágner M. a Vondráková Z. (2000). Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36, 260-267

Vágner M., **Fischerová L.**, Špačková J. a Vondráková Z. (2005). Somatic embryogenesis in Norway spruce. *In: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Eds. Jain S.M. and Gupta P.K., Springer, Netherlands, 141-155*

Vágner M., Vondráková Z., **Fischerová L.** a Opatrná J. (2005). Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as a compromise between liquid and solidified media. *In: Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Eds. Hvoslef-Eide A.K. and Preil W., Springer, Netherlands, 295-302*

Fischerová L., Fischer L., Vondráková Z. a Vágner M. (odesláno do tisku). Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in Norway spruce embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos.

1. ÚVOD

*Convince me that you have a seed there
and I am prepared to expect wonders...*

Henry David Thoreau (1860)

V roce 1985 publikovaly nezávisle na sobě tři laboratoře první práce popisující somatickou embryogenezi jehličnanů. Na počátku, jako primární explantát, bylo zralé či nezralé zygotické embryo, jehož buňky pod vlivem auxinu a cytokininů v médiu prokázaly totipotenci a daly vznik diferencované embryogenní kultuře. Spuštěný proces somatické embryogeneze pak pokračoval, opět řízen přidaným fytohormonem, kyselinou abscisovou. Somatická embrya morfologicky připomínala své zygotické protějšky, měla schopnost klíčit, semenáčky se dále vyvíjely.

Kdyby měl ctihodný Henry D. Thoreau možnost listovat těmito pracemi, nejspíš by se potěšeně usmíval. Schopnost totipotence buněk semene jehličnanů (kromě zygotického embrya i megagametofytu) by pravděpodobně jen utvrdila jeho celoživotní fascinaci semeny. Další práce navíc ukázaly, že tato schopnost semen je víceméně unikátní, že u jehličnanů lze jen velmi obtížně odvodit embryogenní kulturu z vegetativních materiálů.

Následovaly četné další práce. Množství rodů a druhů jehličnanů, u kterých byla popsána somatická embryogeneze, se rozšiřovalo. Jak výzkum pokračoval, bylo stále více zřejmé proč uplynulo více než čtvrtstoletí od objevu somatické embryogeneze u krytosemenných rostlin, než se analogický fenomén podařilo popsat u nahosemenných. Rozdíly v somatické embryogenezi ve srovnání s krytosemennými rostlinami byly totiž více než značné. Fylogenetické stáří jehličnanů a odlišné vývojové cesty se navíc projevíly ve výrazných rozdílech mezi jednotlivými rody jehličnanů.

Více než dvacet let výzkumu somatické embryogeneze jehličnanů bylo dosud možno jen v několika málo případech přetavit v patentované mikropropagační postupy, které jsou komerčně úspěšně využívány pro produkci semenáčků (*Pseudotsuga*, *Picea glauca*, některé druhy *Pinus*). U početné skupiny jehličnanů byla sice somatická embryogeneze popsána, ale proces je stále zatížen problémy, které brání uplatnění v praxi. To je nesporné rozčarování, publikace konce osmdesátých a začátku devadesátých let predikovaly využití nové biotechnologie s podstatně větším optimismem. Přitom kombinace účinné mikropropagační metody

pracující s vybraným elitním genotypem či s cíleně geneticky modifikovaným materiálem nabízí značné využití zejména při výsadbě porostů s předem určeným hospodářským využitím (tzv. crop trees).

Je několik hlavních problémů, které limitují praktické využití. Pro komerčně úspěšnou produkci semenáčků je potřeba, aby proces byl co nejvíce automatizován. To předpokládá využití bioreaktorů, a tedy tekutých živných médií. Vývoj somatických embryí a zejména jejich zrání v tekutém médiu je však u většiny druhů problematický a neuspokojivý. Náklady zvyšují i komplikace při převádění klíčících semenáčků *ex vitro* (mykorrhiza). Značné omezení je skryto na samotném začátku, kde výběr primárního explantátu pro indukci je prakticky omezen na nezralé či zralé zygotické embryo. Prolomit tuto bariéru, tedy indukovat embryogenní kulturu z vegetativních materiálů, by mělo naprosto zásadní význam pro mikropropagaci stromů s konkrétní požadovanou vlastností, danou genotypem.

Byly tedy smělé perspektivy užití somatické embryogeneze pro produkci jehličnanů jen nafouklou bublinou či floskulí vhodnou do příslušných kolonek grantových přihlášek? Zdá se, že ne, jen pionýrské období, kdy se vědci snažili nalézt kultivační postupy pro bezproblémové druhy jehličnanů s cílem vytvořit v praxi okamžitě využitelný mikropropagační systém, skončilo. Nastal čas návratu a pátrání po fyziologických, biochemických a genetických závislostech procesu.

Smrk ztepilý patří mezi druhy, u kterých proces somatické embryogeneze probíhá vcelku uspokojivě. S vysokou procentuální úspěšností lze indukovat embryogenní kulturu, která má ve většině případů dostatečný růstový potenciál. Embryogenní kultura je poměrně stabilní a až na výjimky si roky drží své vlastnosti. Proembrya citlivě reagují na kyselinu abscisovou a jejich vývoj bývá poměrně synchronní. Somatická embrya významného podílu genotypů jsou schopna po desikaci vyklíčit. Embryogenní kulturu je možno úspěšně kryoprezervovat. Na druhou stranu tento příznivý průběh není charakteristický pro všechny embryogenní kultury smrku ztepilého, v míře úspěšnosti somatické embryogeneze existují značné rozdíly mezi genotypy. Právě tyto vlastnosti pasují smrk ztepilý do role ideálního modelu pro studium.

V průběhu disertační práce jsem se věnovala anatomické a biochemické charakterizaci vývoje somatických embryí, a to od fáze proliferace až po fázi klíčení. Ve vztahu ke struktuře embryí popsané na anatomické úrovni jsem sledovala obsah endogenních sacharidů a polyaminů u linie s vysokou embryogenní kapacitou a pro

fáze desikace a klíčení jsem navíc použila jako vztažný systém zygotickou embryogenezi. Desikovaná a klíčící semena jsem podrobila anatomické analýze a stanovila v nich obsah polyaminů. Kromě modelové, vysoce embryogenní linie, jsem ke studiu využila i linie s nižší schopností tvořit embrya, a to pro sledování vlivu různých typů kultivací a pro molekulární analýzu exprese transkripčního faktoru PaVP1, který zprostředkovává přenos signálu kyseliny abscisové. Takto široce pojatá práce měla umožnit co nejlepší pochopení procesu somatické embryogeneze smrku ztepilého. Výsledky studia obsahu polyaminů v somatických a zygotických embryích jsou však toho času připravovány k publikování. Jelikož je předkládaná práce podávána formou svázaných publikací, nemohly být v práci zahrnuty.

2. CÍLE

Získáním podrobnějších poznatků o procesu somatické embryogeneze smrku ztepilého přispět k optimalizaci kultivačních podmínek, a to zejména ve fázi maturace, kdy dochází k vývoji proembryí ve zralá embrya.

Dílčí cíle:

- Popsat anatomické změny v průběhu vývoje somatických embryí na základním maturačním médiu a po přidání nepenetrujícího osmotika PEG 4000 do média.
- Charakterizovat dynamiku změn obsahu nestrukturních sacharidů v průběhu vývoje embryogenní kultury na maturačním médiu a její ovlivnění osmotikem PEG 4000.
- Porovnat úspěšnost různých kultivačních postupů u širokého spektra embryogenních linií (zařazení pre-matuační fáze, užití osmotika v maturaci, kultivace na prámčích).
- Na základě vlastních i převzatých výsledků vytvořit vzorový protokol pro práci s embryogenními kulturami smrku ztepilého.
- Charakterizovat expresi genu pro transkripční faktor PaVP1 v embryogenních liniích s různou schopností tvořit somatická embrya.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Somatická embryogeneze

Životní cyklus kvetoucích rostlin je charakterizován střídáním dvou generací, haploidní (gametofytické) a diploidní (sporofytické). Sporofyt krytosemenných rostlin vzniká dvojitým oplodněním mateřské buňky megaspory. V průběhu oplození proniká pylová láčka do zárodečného vaku a uvolní se z ní dvě spermatické buňky. Splnutím jedné z nich s vaječnou buňkou vzniká zygota, zatímco druhá spermatická buňka splývá s centrální buňkou zárodečného vaku a vzniká triploidní endosperm, který plní převážně vyživující funkci pro vyvíjející se embryo a pro jeho pozdější klíčení (West a Harada 1993). U nahosemenných rostlin k dvojitmu oplození nedochází, jejich endosperm je založen již před oplozením a je haploidní (např. Owens a Molder 1979).

Embryogeneze (vývoj embrya) však může probíhat také alternativně bez oplození či fúze gamet. Původ takových nepohlavních embryí je různý. Apomiktická embrya vznikají z neoplozené vaječné buňky, či z jiné buňky zárodečného vaku. V *in vitro* podmínkách lze získat embrya také z nezralých mikrospor a pylových zrn (Maraschin a kol. 2005), či embrya somatická z buněk somatických (Zimmerman 1993).

Somatická embryogeneze je tedy proces, kdy za indukčních podmínek vznikají ze somatických buněk buňky embryogenní, které jsou dále schopny vývoje v somatická embrya. Ta vznikají řadou morfologických a biochemických změn, které ve velké míře odpovídají změnám probíhajícím při vývoji embrya zygotického v oplodněném vajíčku (Quiroz-Figueroa a kol. 2006).

Somatická embryogeneze je ideálním modelovým systémem pro studium vývoje rostlin, neboť vývoj somatických embryí je na rozdíl od embryí zygotických snadno pozorovatelný, může být cíleně ovlivňován složením média či transformací somatických embryí a velkou výhodou je i produkce dostatečného množství experimentálního materiálu (Quiroz-Figueroa a kol. 2006). Praktické využití somatické embryogeneze spočívá v produkci velkého množství geneticky shodných embryí, která mohou být dále použita pro rozmnožování rostlin s výhodnými či geneticky upravenými vlastnostmi (Taurus a kol. 1991).

3.2. Somatická embryogeneze jehličnanů

Přestože byla somatická embryogeneze popsána u *Daucus carota* již v roce 1958 (Reinert 1958; Steward a kol. 1958), embryogenní kultury jehličnanů byly získány až v roce 1985, a to díky velmi specifickým nárokům na indukci. Poprvé byla popsána třemi na sobě nezávislými skupinami: Hakman a kol. (1985) a Chalupa (1985) indukovali vznik embryogenní kultury ze zygotických embryí *Picea abies*, Nagmani a Bonga (1985) indukovali vznik embryogenní kultury *Larix decidua* z pletiva megagametofytu.

Proces somatické embryogeneze se skládá z několika fází: založení (indukce) embryogenní kultury, její udržování (proliferace), vývoj a zrání somatických embryí (maturace), desikace embryí (u některých druhů rostlin, či u některých genotypů není nutná) a vlastní klíčení.

3.2.1. Zakládání (indukce) embryogenních kultur

Úspěšnost indukce embryogenní kultury se udává počtem (resp. podílem - %) explantátů, na nichž se vytvářejí raná somatická embrya. Je dána výběrem materiálu, typem primárního explantátu, složením média a fyzikálními podmínkami.

Embryogenní kultury mohou vznikat z různých explantátů, úspěšnost indukce je však na typu použitého explantátu velmi závislá. Použití různých výchozích explantátů je různě vhodné pro jednotlivé rostlinné druhy a dokonce i pro jednotlivé genotypy. Nejčastěji jsou embryogenní kultury získávány ze zygotických embryí, a to jak zralých tak nezralých (Atree a Fowke 1993). Jako nezralá jsou označována embrya, u kterých se ještě nevyvinuly dělohy. K indukci somatické embryogeneze lze použít i megagametofyt. Úspěšnost indukce bývá nejvyšší při použití nezralých embryí (Salajová a kol. 1996, Tautorus a kol. 1990). Von Arnold a kol. (1995) dospěli k obecnému závěru, že úspěšnost indukce se snižuje se zvyšujícím se stářím explantátu. Podobně spolu se stárnutím spojeným se zvyšováním obsahu zásobních proteinů v zygotických embryích hybridního smrku *Picea glauca* × *Picea engelmannii* se snižuje jejich schopnost vytvořit embryogenní kulturu (Roberts a kol. 1989). Velmi vzácné jsou případy, kdy se povedlo embryogenní kulturu indukovat i z děložních lístků semenáčků, či jehlic dospělých stromů (Ruaud 1992, Lelu a kol. 1994).

Úspěšnost indukce embryogenní kultury je dále ovlivněna složením indukčního média. Optimální hormonální složení indukčního média je však druhově či dokonce

genotypově závislé. Pro druhy rodu *Picea* je nutná přítomnost cytokininu i auxinu; cytokinin (nejčastěji N⁶-benzyladenin) bývá přidáván v koncentracích pohybujících se okolo 5 μmol.l⁻¹, auxin (nejčastěji 2,4-D) v 5-10 μM koncentracích (např. Mo a von Arnold 1991). Stejně tak u druhů rodu *Pinus* bývají používána média obsahující auxin i cytokinin (např. Bozhkov a kol. 1997), některé genotypy však vyžadují pouze auxin (Becwar a kol. 1990). U druhů rodu *Abies* je vznik embryogenních kultur vázán na použití média obsahujícího pouze cytokinin (Salajová a kol. 1996; Vooková a kol. 1998). Tato zobecnění však neplatí absolutně, například Lelu a kol. (1999) indukovali embryogenní kultury *Pinus sylvestris* a *Pinus pinaster* i na médiu bez růstových regulátorů.

Také u *Daucus carota* (modelového systému somatické embryogeneze krytosemenných rostlin) lze vznik embryogenní kultury indukovat i na médiu bez růstových regulátorů, a to změnami osmotického potenciálu média (vysokou koncentrací sacharosu, NaCl) či přidáním chloridů těžkých kovů do indukčního média (Kiyosue a kol. 1993). Zdá se proto, že vznik embryogenní kultury *Daucus carota* je indukován spíše stresem než přímým působením růstových regulátorů (Nishiwaki 2000). Zda totéž platí i pro indukci embryogenních kultur jehličnanů nebylo zatím ověřeno.

Indukce somatické embryogeneze jehličnanů může být kromě uvedených růstových regulátorů ovlivněna i dalšími modifikacemi ve složení média. Pro indukci embryogenní kultury *Pinus taeda* bylo výhodné obohatit médium o AgNO₃, inhibitor biosyntézy etylénu (Pullman a kol. 2003a). Kombinace MES pufru, biotinu a kyseliny listové dále zvyšovala množství založených embryogenních kultur (Pullman a kol. 2005). Další látkou výrazně ovlivňující úspěšnost indukce je brassinolid, který byl účinný u *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii* a *Picea abies* (Pullman a kol. 2003b).

3.2.2. Udržování (proliferace) embryogenních kultur

Proliferující embryogenní kultury jehličnanů jsou tvořeny velkým množstvím nevyvinutých somatických embryí, která se skládají z meristematické části a suspenzorového systému (von Arnold a kol. 1995). Někteří autoři (například Bozhkov 1995) nazývají tuto kulturu embryonální suspenzorová hmota; embryogenní kultury též bývají označovány jako kultury raných somatických embryí (Hakman 1993). Na základě morfologie a vývojového schématu rozdělila Filonova a kol. (2000a) vývoj

proliferující embryogenní kultury *Picea abies* na tři fáze a označila je jako proembryogenní hmota I, II a III.

Médium, na kterém jsou embryogenní kultury jehličnanů udržovány, mívá obvykle stejné složení jako médium indukční, obsahuje tedy auxin, cytokinin a sacharózu v nízké koncentraci. V některých případech jsou však embryogenní kultury udržovány na médiu se sníženým obsahem růstových regulátorů oproti médiu indukčnímu (např. Krogstrup a kol. 1988). Embryogenní kultury některých druhů jehličnanů lze v této fázi embryogeneze pěstovat i v tekutých médiích. Výhodou této metody je rychlejší růst kultury a nižší riziko poškození při manipulaci s kulturou (Silveira a kol. 2004).

Subkultivační interval embryogenních kultur bývá 1-4 týdny v závislosti na druhu a genotypu. Stejně tak světelné a teplotní podmínky, za jakých jsou kultury udržovány, jsou založeny na zkušenostech s jednotlivými druhy či klony a nelze je zobecnit. Například suspenzní kultura *Picea glauca* byla udržována za stálé ozáření $3-5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při 25°C (Hakman a von Arnold 1988), suspenzní kultura *Pinus taeda* prospívala nejlépe ve tmě při 25°C (Silveira a kol. 2004) stejně jako kultura *Pinus nigra* pěstovaná na zpevněném médiu (Salajová a kol. 1995).

V této fázi vývoje lze udržovat embryogenní kultury po dlouhou dobu, popř. napěstovat dostatečné množství materiálu pro další použití. Kultury ve fázi proliferace je možné také zamrazit a uchovávat v nízkých teplotách (v tekutém dusíku). Tato technika je označována jako kryoprezervace, tj. proces řízeného zamrazování. Je běžně používána u řady jehličnanů mikropropagovaných cestou somatické embryogeneze (Cyr 1999). Jednotlivé druhy i genotypy se však liší v míře tolerance k nízkým teplotám. Zatím nejsou zcela jasné příčiny těchto odlišností. Mezi tolerantní patří např. *Pseudotsuga menziesii*, naopak *Abies alba* a *Picea abies* patří spíše k méně tolerantním druhům (Norgaard a kol. 1993, Cyr a kol. 1994, Park a kol. 1994). Důležitou roli zde nejspíš hraje regenerační schopnost embryogenní kultury, která se uplatňuje v době po rozmrazení. V tomto období může dojít i k selekci buněk, která ovlivní embryogenní kapacitu kultury pozitivně (Galerie a kol. 1992). Předpokladem je, že se zvýší synchronizace vývoje embryí. Řada autorů však tento efekt popírá (např. Norgaard a kol. 1993, Cyr a kol. 1994, von Arnold a kol. 1995).

Použitím kryoprezervace se také může snížit riziko somaklonální variability, neboť lze na minimum omezit trvání proliferační fáze. U embryogenních kultur jehličnanů však byla popsána jen nízká míra somaklonální variability (Fourre a kol.

1997), případně nebyla vůbec prokázána (Cyr a kol. 1994, Isabel a kol. 1993, Nkongolo a Klimaszewska 1994, 1995).

Proliferující embryogenní kultury řady druhů je možné transformovat, a to buď biolistickou metodou či prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*. Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* byla výrazně úspěšnější při použití kmenů se zvýšeným počtem kopií genů virulence. Takto byly transformovány reportérovým genem pro β -glukuronidázu například *Picea abies* a *Pinus taeda* (Wenck a kol. 1999) či *Picea glauca* (Le a kol. 2001). Transformace je v posledních letech velmi využívanou metodou studia somatické embryogeneze jehličnanů (např. Sabala a kol. 2000, Ingouff a kol. 2001, Ciavata a kol. 2002, Mathieu a kol. 2006).

3.2.3. Zrání (maturace) somatických embryí

Další vývoj raných somatických embryí je vázán na přenos embryogenní kultury na maturační médium. To se v původních pracích od indukčního lišilo pouze sníženou hladinou auxinů a cytokininů nebo jejich úplným vynecháním (Hakman a Fowke 1987; Chalupa 1985). Vznikající embrya však vykazovala řadu vývojových poruch a nebyla schopna klíčení. Pozdější studie ukázaly, že úspěšný vývoj somatických embryí jehličnanů je podmíněn přenosem na maturační médium bez auxinů a cytokininů, které však obsahuje kyselinu abscisovou (ABA). O ABA je známo, že pozitivně ovlivňuje i zrání somatických embryí krytosemených rostlin (Kiyosue a kol. 1993), a to zejména synchronizací celého procesu. Práce (především skupiny Sary von Arnold) z posledních let ukazují, že optimálního zrání somatických embryí lze dosáhnout přechodným pěstováním embryogenních kultur na médiu bez růstových regulátorů a posléze jejich přenesením na médium obsahující ABA. Podrobnější popis působení ABA na vývoj somatických embryí je uveden v kapitole 3.3.2.

Dalšího zlepšení vývoje somatických embryí jehličnanů lze dosáhnout obohacením maturačního média o osmotikum. Ovlivnění vývoje somatických embryí však závisí na typu a koncentraci použitého osmotika (sacharidy, polyethylenglykol, dextransy). Většina autorů (Johnson a kol. 1997; Carrier a kol. 1997) předpokládá, že sacharidy přidávané do maturačního média mají několikerou roli. Slouží jako zdroj energie a stavebních prvků buněčné stěny, přímo ovlivňují genovou expresi a zvyšují osmotický potenciál média. Osmotické působení sacharosy při zrání somatických embryí prokázali např. Finer a kol. (1989), Tremblay a Tremblay (1991, 1995).

Jednoduché cukry však nejsou tak účinné jako osmotika s vysokou molekulovou hmotností (větší než 1000 Da, označovaná jako nepenetrující), např. polyethylenglykol (PEG) nebo dextransy. Je to způsobeno tím, že osmotika s malou molekulovou hmotností procházejí do symplastu rostlinného pletiva a dochází k postupnému vyrovnání osmotických potenciálů. Naproti tomu látky s vysokou molekulovou hmotností buněčnou stěnou a plasmatickou membránou neprocházejí a osmotický potenciál je vyrovnáván vlastní tvorbou kompatibilních solutů (Attree a Fowke 1993). Tak například růst embryogenní kultury *Picea glauca* byl pozitivně ovlivněn přidáním PEG 1000 a 4000 a dextranů 6000 a 8000 do maturačního média, nedocházelo k předčasnému zrání embryí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití PEG 4000 (Attree a kol. 1995). Vliv PEG 4000 na vývoj somatických embryí *Picea abies* popsal Find (1997). Při pěstování této kultury na médiu obsahujícím 5% PEG 4000, se zvýšil počet zralých somatických embryí o 50% oproti embryogenní kultuře rostoucí bez PEG.

Zrání somatických embryí je ovlivněno také typem a koncentrací gelu použitého při přípravě zpevněných médií (Klimaszewska a Smith 1997), koncentrací minerálních látek, zvláště nitrátu (Barrett a kol. 1997), typem a koncentrací sacharidu a pH média (Tremblay a Tremblay 1991). Také přidání AgNO_3 , inhibitoru biosyntézy etylénu, do maturačního média vede ke zlepšení dalšího vývoje somatických embryí (Kong a Yeung 1995).

Úspěšnost maturace je dána počtem zralých somatických embryí. Embryogenní kultury se vyvíjejí nesynchronně, jen část embryí je schopná dokončit maturaci. Podmínky maturace však mohou měnit poměr mezi celkovým počtem embryí na počátku a zralých embryí na konci maturace (Bozhkov a kol. 2002). Kritériem úspěšného průběhu maturace je nejen množství, ale i kvalita embryí. O ní vypovídá jednak jejich anatomická stavba, jednak úroveň metabolické aktivity a následné ukládání zásobních látek, charakteristické především pro pozdější fáze vývoje somatického embrya. Z hlediska ukládání látek lze embryo jehličnanů rozdělit do dvou zón: hypokotyl a dělohy jsou místa ukládání zásobních látek (lipidy, škrob, proteiny), zatímco bazální část akumuluje polyfenoly, tedy látky sekundárního metabolismu (Gutman a kol. 1996).

Ukládání zásobních látek je v somatických embryích jehličnanů stimulováno ABA a především osmotikem. ABA stimulovala akumulaci lipidů u embryogenní kultury *Picea abies* (von Arnold a Hakman 1988). V porovnání s embryí

zygotickými však somatická embrya *Picea glauca* pěstovaná na maturačním médiu obsahujícím ABA obsahovala dvakrát méně zásobních lipidů. Tento rozdíl byl smazán přidáním PEG 4000 do maturačního média (Atree a kol. 1992). V pozdější studii Atree a kol. (1995) dokonce po aplikaci PEG 4000 pozorovali až 5x vyšší obsah lipidů v somatických embryích oproti embryím zygotickým. Osmotický stres indukoval také akumulaci zásobních proteinů a jejich transkriptů v somatických embryích *Picea glauca* × *Picea engelmannii* (Flinn a kol. 1993). Spektrum zásobních proteinů této kultury se nelišilo od spektra zásobních proteinů v zygotických embryích, avšak jejich absolutní množství se u jednotlivých linií lišilo (Flinn a kol. 1991). Škrob je další významnou zásobní látkou v somatických embryích jehličnanů. Jeho ukládání předchází tvorbě zásobních lipidů a proteinů (Joy a kol. 1991). U kultur pěstovaných bez osmotika však byla škrobová zrna pozorována až do stádia s vyvinutými dělohami, což dokládá, že změnu v ukládání zásobních látek ve prospěch lipidů a proteinů opravdu způsobuje stres z nedostatku vody (Attree a Fowke 1993).

3.2.4. Desikace a klíčení somatických embryí

Hodnocení úspěšnosti procesu somatické embryogeneze je dáno počtem somatických embryí schopných klíčit a vyvíjet se dále v rostliny. Významnou etapou somatické embryogeneze, která klíčení ovlivňuje, je desikace, tj. doba, kdy jsou již plně vyvinutá somatická embrya vystavena podmínkám, za kterých dochází k postupnému úbytku vody v embryích. Desikace somatických embryí je paralelou vysychání, ke kterému dochází v pozdních fázích vývoje zygotického embrya v semeni. Desikace však není charakteristická pouze úbytkem vody v embryích, ale především jejich biochemickým dozráváním. Vnější morfologie desikovaných somatických embryí *Picea glauca* pozorovaná rastrovacím elektronovým mikroskopem se velmi podobala zralým embryím zygotickým (Fowke a kol. 1994).

Pro úspěšné klíčení byla desikace nezbytná například u somatických embryí *Picea sitchensis* a *Picea glauca* (Roberts a kol. 1991, Find 1997). Na druhou stranu však Bomal a Tremblay (1999) nenalezli rozdíly v úspěšnosti klíčení somatických embryí *Picea mariana*, která byla a nebyla vystavena desikačním podmínkám. Dá se tedy říci, že fáze desikace není nutná pro všechny druhy, případně genotypy, embryogenních kultur jehličnanů.

Tolerance somatických embryí k desikaci záleží na jejich kvalitě a také na podmínkách desikace. Lze ji zvýšit působením ABA (Beardmore a Charest 1995) a osmotika (Attree a kol. 1995) v předchozích stádiích vývoje, případně působením nízkých teplot na zralá somatická embrya (Pond a kol. 2002). Další nutnou podmínkou úspěšného průběhu desikace je vysoká (97%) vzdušná vlhkost, při které proces probíhá (Bomal a Tremblay 1999, Högberg a kol. 2001).

Desikace ovlivňuje somatická embrya na několika úrovních. V průběhu desikace se v somatických embryích snižuje množství zásobních proteinů, u *Picea glauca* × *Picea engelmannii* docházelo ke stejnému poklesu i v průběhu desikace embryí zygotických (Flinn a kol. 1993). U somatických embryí *Picea glauca* bylo v průběhu desikace pozorováno hromadění nukleotidů, pravděpodobně jako příprava na pozdější klíčení (Stasolla a kol. 2001a). Desikace také snižuje hladinu ABA v somatických embryích (Find 1997). Tím přímo ovlivňuje úspěšnost klíčení, neboť endogenní ABA v somatických embryích klíčení inhibuje (Lelu a Label 1994), podobně jako je tomu u semen mnoha rostlinných druhů (Holdsworth a kol. 1999). Zvýšení počtu klíčících somatických embryí lze dosáhnout i přidáním aktivního uhlí do média, na kterém embrya klíčí (např. Vooková a kol. 1998); aktivní uhlí zde slouží k odstranění fytohormonů z embryí.

Médium, na kterém probíhá klíčení, obvykle obsahuje také nízkou hladinu sacharózy. Carrier a kol. (1997) zjistili, že přidání 1 % sacharózy do média zpomalilo pokles obsahu lipidů, ke kterému docházelo při klíčení somatických embryí *Picea glauca* × *Picea engelmannii*. U embryí pěstovaných v přítomnosti sacharózy se také postupně zvyšoval obsah kyseliny linolenové, která je hlavní složkou chloroplastových membrán a je podle autorů možným markerem úspěšnosti klíčení. Růst kořene lze u somatických embryí podpořit přidáním indolyl-3-máselné kyseliny (Vooková a Kormuťák 2001), naopak růst nadzemní části a zakládání nových růstových primordií lze ovlivnit přidáním kyseliny askorbové (Stasolla a kol. 1999). V menší míře kyselina askorbová pozitivně ovlivňuje i růst kořenů. Vývoj nadzemní části ovlivňuje kyselina askorbová pravděpodobně tím, že indukuje organizované buněčné dělení v apikálním meristému. Dalším efektem přidání kyseliny askorbové do média, na kterém probíhá klíčení, je zvýšená schopnost somatických embryí využívat adenin a adenosin, prekurzory purinů (Stasolla a kol. 2001b).

Po fázi klíčení jsou klíční rostliny, u kterých se již vyvinul primární kořen a u kterých z apikálního meristému vyrostly první lístky, přenášeny do podmínek *ex vitro* (Högberg a kol. 2001). Následný růst a vývoj těchto rostlin již není zahrnován do procesu somatické embryogeneze, proto jsem se mu v přehledu literatury nevěnovala.

3.3. Vybrané kapitoly somatické embryogeneze jehličnanů

3.3.1. Vývoj somatických embryí

Názvosloví používané při popisu vývoje somatického embrya je odvozené od názvosloví klasické embryologie nahosemenných rostlin, proto se nejprve krátce zmíním o zygotické embryogenezi.

3.3.1.1. Vývoj zygotického embrya

Vývoj zygotického embrya bývá popisován jako dvoufázový proces: V první morfo-genetické fázi vznikají základní struktury embrya, zatímco druhá metabolická fáze je charakterizovaná biochemickou přípravou embrya na klidové stádium (Harada 1999). Je však třeba mít na mysli, že jde pouze o formální rozdělení, neboť obě fáze se překrývají. Morfo-genetická fáze vývoje zygotického embrya může být dále rozdělena na několik na sebe navazujících stádií, u nahosemenných rostlin označovaných jako proembryogeneze, raná embryogeneze a pozdní embryogeneze. Jako proembryogeneze jsou označována stádia vývoje embrya před prodlužováním suspenzoru, raná embryogeneze pak trvá od prodlužování suspenzoru po ustavení primárního kořenového meristému a pozdní embryogeneze je charakterizována intenzivní tvorbou pletiv včetně založení primárního kořene a apikálního meristému (Singh 1978).

Pro nahosemenné rostliny je charakteristická polyembryonie, což je vývoj více než jednoho embrya v nezralém semeni. Dochází k ní buď oplozením více než jednoho vajíčka a vznikem několika zygot (jednoduchá polyembryonie), anebo častěji rozdělením jedné zygoty na několik částí, které jsou schopné vývoje jako jednotlivá proembrya (štěpná polyembryonie). Většinou však pouze jedno proembryo pokračuje ve vývoji ve zralé embryo (Owens a Molder 1979).

3.3.1.2. Vlastní vznik somatických embryí

U jehličnanů byly popsány tři způsoby vzniku somatických embryí:

1) Somatická embrya primárně vznikají asymetrickým dělením somatické buňky, které vymezí oblast budoucího embrya a suspensoru. Vzniká buňka s hustou cytoplasmou, která je připojená k vysoce vakuolizované buňce označované jako primární suspensor. Tato dvojice buněk vytváří bipolární systém. Bipolární charakter si embrya zachovávají po celou dobu svého vývoje. Po vytvoření dvoubuněčného stádia dochází k opakovanému dělení buňky s hustou cytoplasmou, jehož výsledkem je řada morfologicky podobných buněk. Pod nimi je stále primární suspensor (Tautorus a kol. 1991, Jasik a kol. 1995). Toto stádium bývá též označováno jako proembryogenní hmota I (Filonova a kol. 2000a). Ta se dále vyvíjí v proembryogenní hmotu II, charakterizovanou přítomností více než jedné vakuolizované buňky. Pro obě tato stádia je typické polární uspořádání. Dalším růstem proembryogenní hmoty II vzniká proembryogenní hmota III, která obsahuje jednotlivé shluky meristemických buněk volně propojených vakuolizovanými buňkami. Tyto shluky již nemají polární uspořádání.

2) Somatická embrya mohou vzniknout také sekundárně z malých meristemických buněk v suspensoru. Tautorus a kol. (1991) se domnívají, že tyto iniciály mají původ v asymetrickém dělení jedné z buněk suspensoru či meristemické buňky, která se během vývoje raného somatického embrya náhodně oddělila a ponořila mezi buňky suspensoru. Filonova a kol. (2000a) usuzují, že tento proces se shoduje s jejich pozorováním, při kterém vznikala proembryogenní hmota I z více vyvinutých stádií (proembryogenní hmoty II a III).

3) Somatická embrya mohou vzniknout také mechanismem shodným se štěpnou polyembryonií. Výsledkem je několik somatických embryí, která mají společný suspensor (Jasik a kol. 1995, Korlach a Zoglauer 1995).

Výše uvedenými způsoby vznikají somatická embrya na indukčním, případně proliferačním médiu, za přítomnosti auxinů a cytokininů. Další vývoj somatických embryí probíhá fázemi srovnatelnými s ranou a pozdní zygotickou embryogenezí, a to buď přímo na maturačním médiu (s kyselinou abscisovou) nebo bývá mezi fází proliferace a maturace vřazena přechodná fáze kultivace bez růstových regulátorů (Bozhkov a kol. 2002). Na médiu bez růstových regulátorů vznikají raná somatická embrya, která již mají vyvinutou vrstvu protodermálních buněk a obsahují embryonální trubicové buňky (embryonal tube cells), ze kterých později vzniká

sekundární suspensor (Filonova a kol. 2000a). Tento vývojový krok je spojen s programovanou buněčnou smrtí zbývající proembryogenní hmoty. V buňkách proembryogenní hmoty dochází k postupné autolýze a tvorbě velké centrální vakuoly, jaderná DNA se rozpadá. Programovanou buněčnou smrtí zanikají také buňky suspensoru v průběhu rané embryogeneze (Filonova a kol. 2000b).

Prvním diferencovaným pletivem zygotického i somatického embrya je protoderm. U somatických embryí *Picea abies* byla jeho diferenciace spojena s lokální expresí genu *PaHBI* (*Picea abies* homeobox 1). Ektopická exprese *PaHBI* vedla k brzkému zablokování vývoje embryí (Ingouff a kol. 2001). Další gen, jehož exprese je lokalizovaná do buněk protodermu, kóduje nespecifický přenašeč lipidických látek (lipid transfer protein Pa18). Transgenní embrya se zvýšenou či sníženou hladinou tohoto proteinu se sice vyvíjela, avšak buňky jejich vnější vrstvy byly protáhlé a vakuolizované (Sabala a kol. 2000). V obou těchto studiích autoři dále ukázali, že při regulaci vývoje protodermu se u jehličnanů a krytosemenných rostlin uplatňují podobné mechanismy.

Další vývoj ranného somatického embrya je již vázán na přítomnost ABA v médiu (Bozhkov a kol. 2002). V průběhu pozdní embryogeneze probíhá diferenciace pletiv. V bazální části embrya se zakládá kořenový meristém, střední část embrya je tvořena kortexem, prokambiem a dření. Zároveň se vyvíjí i apikální meristém a nakonec jsou založena děložní primordia. Z nich posléze prorůstají dělohy (Filonova a kol. 2000a).

Pro popis vývoje somatického embrya bylo vytvořeno několik systémů morfologických klasifikací. Hakman a von Arnold (1988) dělí vývoj somatických embryí na 4 stádia: stádium 1 - embrya se skládají pouze z oblasti malých meristemických buněk s hustou cytoplasmou, která je spojena s dlouhými suspensorovými buňkami; stádium 2 - embrya vyčnívají nad povrch embryogenní hmoty, jsou neprůhledná s hladkým a lesklým povrchem a s embryogenní hmotou jsou spojena dlouhými, vysoce vakuolizovanými buňkami suspensoru; stádium 3 - somatická embrya s vyvinutými dělohami; stádium 4 - mladé zelené rostliny. Stádium 3 strukturálně odpovídá zygotickému embryu ve zralém semeni. Vyvíjející se embrya byla klasifikována na základě vnější morfologie, jejich vnitřní struktura nebyla do této klasifikace zahrnuta. Nagmani a kol. (1995) aplikovali na celý proces somatické embryogeneze klasifikaci používanou pro popis vývoje zygotických embryí. Tato klasifikace rozděluje vývoj zygotických embryí do 13 kroků, zabývá se

však především fází proembryogeneze. Další klasifikační systém vytvořili Pullman a Webb (1994), kteří rozdělili vývoj zygotického embrya do 9 stádií. Tuto klasifikaci pak použili i k popisu somatické embryogeneze *Picea abies*, *Pinus taeda* a *Pseudotsuga menziesii*.

3.3.1.3. Rozdíly mezi embryogenními kulturami

Schopnost jednotlivých embryogenních kultur produkovat zralá embrya je různá. Embryogenní buněčné linie *Picea abies* lze podle morfologie a podle jejich schopnosti tvořit somatická embrya rozdělit do dvou skupin (Egertsdotter a von Arnold 1993, Mo a kol. 1996): do skupiny A se řadí kultury, jejichž proembrya mají dobře rozlišitelnou meristematickou oblast a suspenzorovou část, a která jsou v přítomnosti ABA schopná vývoje ve zralé somatické embryo (Filonova a kol. 2000a); do skupiny B se pak řadí kultury obsahující proembrya s malými meristematickými oblastmi, které jsou obklopeny vysoce vakuolizovanými buňkami. Některé z těchto linií vůbec nereagují na přítomnost ABA v médiu a nikdy neprodukují embrya. Některé linie sice embrya produkují, ovšem tato embrya vykazují řadu vývojových poruch a nejsou schopna klíčit. V porovnání s embryi z linií A je u těchto embryí zpožděna diferenciací pletiv a posléze dochází i k jejich rozpadu (Filonova a kol. 2000a).

Egertsdotter a kol. (1993) rozdělili embryogenní linie podle produkovaných extracelulárních proteinů opět do dvou skupin (A a B), které se lišily i morfologií embryí. Toto rozdělení odpovídá výše popsanému rozdělení embryogenních linií, neboť skupina A byla charakteristická embryi s hustě nahlučenými meristematickými buňkami a skupina B embryi s nekompaktní oblastí meristematických buněk. Embrya skupiny A vykazovala lepší pozdější vývoj. Přidání extracelulárních proteinů produkovaných embryogenní buněčnou linií ze skupiny A k embryogenní linii ze skupiny B vedlo ke změně morfologie embryí, která se poté podobala embryím ze skupiny A. Zdá se tedy, že embryogenní buněčné linie skupiny A vylučují proteiny nutné pro normální vývoj somatických embryí.

Pozdější studie Egertsdotter a von Arnold (1995) prokázala, že aktivní složkou extracelulárních proteinů zodpovědnou za normální vývoj somatických embryí jsou arabinogalaktany. V proliferující proembryogenní hmotě *Picea abies* byly nalezeny arabinogalaktany reagující s protilátkou proti JIM13 epitopu arabinogalaktanů izolovaných z embryogenní kultury *Daucus carota* (Filonova a kol. 2000a). V raných

somatických embryích však tyto arabinogalaktany nalezeny nebyly. Arabinogalaktany byly nalezeny jak v extracelulárních proteinech somatických embryí skupiny A, tak v extraktu ze semen *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold 1995). Arabinogalaktany tedy byly aktivní složkou kondicionovaného média. Arabinogalaktany jsou proteoglykany, které jsou připojené k plasmatické membráně či k buněčné stěně. Z 90 % jsou tvořeny cukernými zbytky a obsahují také lipidickou složku. Předpokládá se, že jejich štěpením jsou uvolňovány oligosacharidy se signální funkcí (von Arnold a kol. 2002). Jejich přesná chemická struktura zatím nebyla popsána, ale zdá se, že by mohlo jít o lipochitooligosaccharidy (LCO).

LCO jsou signální molekuly způsobující dělení buněk, patří mezi ně i Nod-faktory produkované bakteriemi rodu *Rhizobium*. Dyachok a kol. (2000) prokázali, že Nod-faktory podporují vývoj proembryogenní hmoty, nikoliv však následný vývoj embryí, a že jsou schopny nahradit auxin a cytokinin při stimulaci dělení embryogenních buněk. V následující práci Dyachok a kol. (2002) izolovali z embryogenních kultur *Picea abies* endogenní LCO, které měly stejný efekt jako Nod-faktory a které nebyly nalezeny v neembryogenních liniích. Množství endogenních LCO bylo vývojově regulováno, nejvyšší hladiny byly nalezeny v proembryogenní hmotě, v průběhu následujícího vývoje embryí jejich množství klesalo. Vysoké hladiny endogenních i exogenně přidaných LCO potlačovaly buněčnou smrt nutnou pro vývoj embryí z proembryogenní hmoty. Stejný efekt mělo také přidání chitinázy ze *Streptomyces griseus*. To je v souladu s prací Egertsdotter a von Arnold (1998), kde endochitináza z cukrové řepy také stimulovala proliferaci proembryogenní hmoty. Chitinázy jsou enzymy štěpící jako primární substrát chitin. Ten se v rostlinách nevyskytuje, van Hengel a kol. (2001) však prokázali, že chitinázy jsou schopny štěpit i arabinogalaktany. V průběhu růstu embryogenní kultury *Picea abies* na médiu bez růstových regulátorů docházelo ke zvýšení transkripce i translace genů pro *Chia4-Pa* chitinázy (Wiweger a kol. 2003). Další analýzy prokázaly, že k expresi *Chia4-Pa* dochází nejen v proliferačních buňkách, ale také v buňkách bazální části raných somatických embryí, což jsou místa, kde dochází k programované buněčné smrti.

Shrnutí výše popsaného potvrzuje teorii (von Arnold a kol. 2002), že působením endochitináz jsou z arabinogalaktanů uvolňovány endogenní LCO, které jsou strukturně analogické Nod-faktorům z *Rhizobium*, a které fungují jako signální molekuly stimulující vývoj somatických embryí.

3.3.2. Role ABA v somatické embryogenezi jehličnanů

I když není známo přesné působení ABA, je jisté, že u jehličnanů výrazně ovlivňuje průběh maturace somatických embryí. Její přítomnost v médiu spouští vývoj dalších stádií z raných somatických embryí, zvyšuje jejich počet a celý proces synchronizuje. Dále snižuje množství špatně vyvinutých embryí, brání předčasnému klíčení embryí a stimuluje ukládání zásobních látek. Všechny úrovně působení ABA popsali například Gutman a kol. (1996), kteří porovnávali zrání somatických embryí hybridního modřínu *Larix × leptoeuropaea* na médiích s přidáním a bez přidání ABA.

Po prvním týdnu kultivace na maturačních médiích nebyl mezi variantami pozorován žádný rozdíl. Embrya byla globulární, v oblasti budoucí kořenové čepičky se nacházely vakuolizované buňky obsahující polyfenoly. Po dvou týdnech na médiu s ABA se vyvíjela embrya cylindrického tvaru, byla pozorována častá dělení buněk a buňky obsahující polyfenolické látky byly rozmístěny náhodně v bazální části embrya. Na médiu bez přídavku ABA zůstávala embrya v globulární fázi vývoje, buňky střední části embrya byly vysoce vakuolizované, častější byl i výskyt buněk s polyfenoly. Po třech týdnech se u embryí pěstovaných na médiu s ABA vyvíjely dělohy a kořenový pól. Polyfenoly byly nalezeny pouze v bazální části embrya. Naproti tomu embrya rostoucí bez ABA se pouze prodloužila (díky růstu buněk, ne jejich dělení), bazální část těchto embryí byla pokryta vrstvou buněk kořenové čepičky, které akumulovaly polyfenoly. Během čtvrtého týdne se v embryích rostoucích na médiu obsahujícím ABA začaly ukládat zásobní proteiny, a to v podobě granulí či krystalů. U embryí rostoucích bez ABA nebyly zásobní proteiny nalezeny. Roberts a kol. (1990) navíc prokázali, že záleží také na koncentraci exogenní ABA v médiu. Teprve při koncentracích 30-40 μM vznikala u embryogenní kultury *Picea glauca* × *Picea engelmannii* embrya, která obsahovala stejné zásobní proteiny, jako byly nalezeny v zygotických embryích. Při nižších koncentracích ABA vznikala embrya zavalitá či embrya předčasně zralá, která zásobní proteiny neobsahovala. Akumulace zásobních látek během pěstování na médiu obsahujícím ABA byla pozorována i u *Picea glauca* (Hakman a von Arnold 1988). Zde se somatická embrya bez ABA vůbec nevyvíjela. Někteří autoři (např. Attree a Fowke 1993) se domnívají, že pozitivní vliv ABA na vývoj somatických embryí je dán především ovlivněním ukládání zásobních látek. Tuto myšlenku

dokládají srovnáním s embryogenezí zygotickou. Během pozdní fáze vývoje zygotického embrya v semeni totiž dochází k akumulaci kyseliny abscisové, která zabraňuje předčasné zralosti embryí. ABA zde aktivuje geny (*rab* geny), jejichž produkty kontrolují ukládání zásobních látek a LEA (late embryogenesis abundant) proteinů. Ty hrají důležitou roli v řízení tolerance k desikaci (Skriver a Mundy 1990).

Důležitá je doba, po kterou jsou embrya pěstována na médiu s ABA. Dlouhotrvající přítomnost ABA v maturačním médiu negativně ovlivňuje fázi klíčení somatických embryí. Vysoký obsah ABA v médiu během pozdních fází vývoje somatických embryí vedl k její akumulaci v embryích *Larix x leptoeuropaea*, což mělo za následek zpomalení nebo i inhibici klíčení (Gutman a kol. 1996). Lelu a Label (1994) pozorovali, že nejvíce embryí stejné kultury se vyvíjelo v rostliny po 3 týdnech maturace na médiu s ABA, delší kultivace klíčení neprosplávala. Podobně Bozhkov a von Arnold (1998) uvádějí, že počet klíčících somatických embryí *Picea abies* byl vyšší u varianty pěstované na maturačním médiu pět týdnů ve srovnání s variantou rostoucí na maturačním médiu sedm týdnů.

Koncentrace endogenní ABA je u somatických embryí závislá na množství ABA v maturačním médiu. Po přenesení embryogenní kultury *Picea abies* na maturační médium obsahující ABA se množství endogenní ABA prudce zvýšilo, toto zvýšení korelovalo s koncentrací ABA v médiu. Po odstranění ABA z média hladina endogenní ABA poklesla, stále však zůstávala vysoká ve srovnání se stavem před přenesením na maturační médium (Vágner a kol. 1998). V embryích *Larix x leptoeuropaea* byla nejvyšší hladina endogenní ABA detekována po pátém týdnu růstu na médiu s 60 μM ABA (Lelu a Label 1994). ABA byla detekována v řádově nižší koncentraci i v embryích rostoucích bez jejího exogenního dodání, což svědčí o schopnosti embryí ABA syntetizovat. Tato syntéza však není pro řízení vývoje somatických embryí dostačující. Dunstan a kol. (1988) sledovali vliv ABA a jejích analogů na vývoj somatických embryí *Picea glauca*. Rostliny obecně jsou schopné analogy ABA přeměnit na ABA, zde však byly některé analogy ABA schopné pouze spustit vývoj embryí, ten se však posléze zastavil a u embryí se nevyvíjely dělohy.

Nutnost přítomnosti exogenní ABA pro úspěšnost somatické embryogeneze lze vysvětlit, podíváme-li se na situaci v embryích zygotických. V průběhu zrání semen většiny rostlin byly popsány dva vrcholy akumulace ABA. První, který bezprostředně předchází začátku zrání semen, je syntetizován mateřským pletivem a

teprve druhý vrchol akumulace ABA je syntetizován vlastním embryem (Karszen a kol. 1983). Tento druhý vrchol akumulace ABA je nezbytný pro indukci dormance, kterou si semena udrží i poté, co hladina ABA na konci zrání prudce klesá (Finkelstein a kol. 2002).

4. DISKUZE

4.1. Indukce a proliferace embryogenních kultur

Jako primární explantát byla k indukci embryogenních kultur použita nezralá i zralá zygotická embrya. Úspěšnost indukce byla vyšší při použití nezralých embryí, také riziko kontaminace bylo nižší. Na druhou stranu bylo nutné přesné načasování sběru šišek a jejich okamžité použití. Ze zralých zygotických embryí lze embryogenní kultury indukovat kdykoliv v průběhu roku, neboť lze použít skladovaná semena (Vágner a kol. 2005a).

Většina embryogenních kultur používaných v našich studiích náleží podle klasifikace Jalonen a von Arnold (1991) do skupiny A. Jsou tedy schopny produkovat zralá somatická embrya, která se pak dále vyvíjejí v rostliny. Pouze embryogenní linie C203 patří do skupiny B, charakterizované dobrým růstem v průběhu proliferace, avšak neschopností vytvářet embrya. Na mikroskopické úrovni jsme pozorovali struktury charakteristické pro embryogenní kultury jehličnanů. Embryogenní kultury se skládaly z oblastí meristemických buněk, pod kterými byly připojeny vysoce vakuolizované buňky suspensoru (Svobodová a kol. 1999, Fischerová a kol., odesláno do tisku). Stejnou stavbu proliferující embryogenní kultury popisují i další autoři (např. Jasik a kol. 1995, Filonova a kol. 2000a).

Vybrané embryogenní kultury byly v průběhu proliferace úspěšně zamrazeny (Vágner a kol. 2005a), což umožnilo jejich dlouhodobé skladování v tekutém dusíku. I když se díky kryoprezervaci zkracuje doba proliferace, a tedy i riziko somaklonální variability, je nutné si uvědomit, že v průběhu kryoprezervace je používán dimethylsulfoxid (DMSO) a to ve vysokých koncentracích. DMSO je mutagenní látka potenciálně schopná vyvolat po kryoprezervaci genetické změny v embryogenních kulturách (Aronen a kol. 1999).

Mezi fází proliferace a maturace bývá někdy vřazována fáze kultivace embryogenní kultury na médiu bez růstových regulátorů (Bozhkov a kol. 2002). Týdenní kultivace vybraných embryogenních kultur na médiu bez růstových regulátorů výrazně zvýšila počet zralých somatických embryí (Vágner a kol. 2005b). Odstranění, či alespoň částečné snížení obsahu auxinů a cytokininů stimuluje programovanou buněčnou smrt v proembryogenní hmotě. Programovaná buněčná smrt je proces úzce spojený s následným vývojem raných somatických embryí (Filonova a kol. 2000b).

4.2. Maturace embryogenních kultur

Po přenesení embryogenní kultury z proliferačního na maturační médium dochází k vývoji embrya srovnatelnému s ranou a pozdní embryogenezí embrya zygotického (von Arnold a kol. 2002). Stejný průběh vývoje embrya jsme pozorovali i u embryogenní kultury AFO 541, typického zástupce embryogenních linií skupiny A (Svobodová a kol. 1999). Jako první se zakládal protoderm, posléze se začaly vyvíjet i vnitřní struktury embrya. Po šesti týdnech kultivace na maturačním médiu již byla embrya plně vyvinutá, měla zřetelný apikální meristém, dobře vyvinuté dělohy, prokambiální provazce, kořenový meristém a kořenovou čepičku. Stejný postup diferenciací pletiv somatických embryí *Picea abies* popsali i Filonova a kol. (2000a). Déle trávající maturace (7 a 8 týdnů) vedla pouze k rozvolnění povrchových vrstev embrya. To bylo spojeno s ukládáním fenolických látek a škrobových zrn (Svobodová a kol. 1999). Akumulace fenolických látek je u jehličnanů spojena se stresovými podmínkami (Gutmann a kol. 1996). K vývojovým poruchám docházelo především v místech kontaktu embryí s médiem, s jinými embryí, či v místech mechanického poškození embryí způsobeného při subkultivaci kultur (Svobodová a kol. 1999). Posledně jmenovanému riziku se lze vyhnout pěstováním embryogenních kultur na prámčích s polypropylenovou membránou, což je systém používaný u řady *in vitro* kultur (např. Watad a kol. 1995). Použití tohoto systému u embryogenních kultur *Picea abies* se ukázalo velmi výhodným. Počet zralých somatických embryí se zvýšil u 7 z 12 testovaných linií, celý proces byl lépe synchronizován a průměrně o 6 dní urychlen (Vágner a kol. 2005b). Zkrácení doby, po kterou jsou embrya vystavena působení vysokých koncentrací ABA v maturačním médiu, je prospěšné, neboť ABA v embryích inhibuje klíčení (Bozhkov a von Arnold 1998).

Přidání polyethylenglykolu 4000 (PEG 4000) do maturačního média vedlo k urychlení celého procesu, tento efekt byl výraznější u varianty s nižší (3,75%) koncentrací PEG 4000. Obě použité koncentrace (3,75 % a 7,5 %) měly pozitivní vliv na vývoj kořenové čepičky embryí, nedocházelo k jejímu rozpadu, který byl častý u varianty bez PEG (Svobodová a kol. 1999). Hakman a von Arnold (1988) přičítají pomalý růst rostlin ze somatických embryí *Picea glauca* právě špatně vyvinutému kořenovému pólu embryí. Bozhkov a von Arnold (1998) pozorovali vývoj kořenové čepičky embryí *Picea abies* na médiu se 7,5 % PEG, kořenová

čepička těchto embryí byla masivní a obsahovala četné mezibuněčné prostory. V naší studii způsobil 7,5% PEG prodloužení kořenové čepičky až o 40 % ve srovnání s variantou s 3,75% PEG, žádné mezibuněčné prostory však nebyly pozorovány (Svobodová a kol. 1999). Stasolla a kol. (2003) popsali u embryogenní kultury *Picea glauca* ošetřené 7,5% PEG zvýšení exprese genu homologního *SCR* (*SCARECROW*). *SCR* je u *Arabidopsis thaliana* odpovědný za radiální růst kořene, neboť určuje identitu endodermis. Autoři se proto domnívají, že PEG může ovlivňovat i radiální symetrii kořenů somatických embryí a pozitivně tak působit na jejich následné klíčení.

Somatická embrya *Picea abies* pěstovaná na médiu s přídavkem 5% PEG 4000 byla znatelně menší a vyskytovaly se u nich některé strukturní abnormality jako dutiny pod apikálním meristémem (Find 1997). Tvorbu prasklin a řady mrtvých buněk jsme pozorovali na konci maturace v kortexu některých embryí vyvíjejících se v přítomnosti 7,5% PEG, žádné praskliny a řady mrtvých buněk jsme však nenalezli v embryích rostoucích na médiu s 3,75% PEG. Kvantitativní analýzou jsme prokázali, že embrya rostoucí na médiích obsahujících PEG v obou koncentracích byla v každém kroku vývoje delší než embrya rostoucí bez přítomnosti PEG (Svobodová a kol. 1999).

Úspěšný průběh maturace je charakterizován vysokým počtem zralých somatických embryí. O jejich kvalitě vypovídá jednak jejich anatomická stavba, jednak úroveň metabolické aktivity a následné ukládání zásobních látek, charakteristické především pro pozdější fáze vývoje somatického embrya (Gutman a kol. 1996). Akumulace zásobních látek je pro somatická embrya nezbytná, neboť jejich klíčení probíhá bez podpory megagametofytu, hlavního zásobního orgánu semen (Misra a Green 1990). Soustředili jsme se proto též na charakterizaci maturace jako procesu ukládání zásobních látek.

V průběhu maturace jsme sledovali obsah nestrukturních sacharidů v embryogenní kultuře AFO 541 (Lipavská a kol. 2000). Celková hladina rozpustných sacharidů se zvýšila s přenesením kultury na základní maturační médium, s pokračujícím růstem kultury však klesala. Tento pokles byl způsoben snížením hladin hexos (glukosy a fruktosy), množství sacharosy se naopak v průběhu maturace zvyšovalo. Za tento posun ve prospěch sacharosy byla odpovědná vyvíjející se somatická embrya. Otázkou zůstává, zda se jednalo pouze o akumulaci sacharosy z média či o její *de novo* syntézu. Podle práce Konrádová a

kol. (2002) se zdá, že se jedná spíše o syntézu *de novo*, neboť buňky v blízkosti vyvíjejícího se embrya, které zprostředkovávají kontakt embrya s médiem, obsahovaly vysoké hladiny hexos a vykazovaly vysokou aktivitu invertázy. Ta byla vysoká též v somatických embryích na počátku maturace, zatímco aktivita sacharosa-syntázy byla v těchto embryích nízká. Pozdní fáze maturace somatických embryí byly naopak charakteristické téměř nedetekovatelnou aktivitou invertázy a zvyšující se aktivitou sacharosa-syntázy. Iraqi a Tremblay (2001) pozorovali, že pokles aktivity invertáz na konci maturace byl spojen se zvyšujícím se poměrem sacharosy ku hexosám a následné akumulaci škrobu a proteinů. Výše popsaná pozorování odpovídají představě, že vyvíjející se somatické embryo se z metabolického sinku stává sinkem zásobním (Lipavská a Konrádová 2004), tak, jako se tomu děje i ve vyvíjejícím se semeni (Weber a kol. 1997).

Další zásobní látkou v somatických embryích jehličnanů je škrob. Jeho ukládání předchází tvorbě zásobních lipidů a proteinů (Joy a kol. 1991). Pomocí histochemické detekce jsme popsali dynamiku ukládání škrobu v průběhu zrání somatických embryí (Lipavská a kol. 2000). V raných somatických embryích nebyl škrob nalezen, k jeho pomalé akumulaci docházelo po dvou týdnech kultivace na maturačním médiu. Škrobová zrna se po celou dobu zrání embryí preferenčně ukládala v bazální části a po jejím založení v kořenové čepičce embryí. Preferenční ukládání škrobu v bazální části embrya popsali i Joy a kol. (1991). Po pěti týdnech maturace se škrobová zrna nacházela i v buňkách kortexu. Následná kultivace embryí na maturačním médiu vedla ke snížení obsahu škrobu (Lipavská a kol. 2000). Ve zralých zygotických embryích *Picea glauca* nebyl škrob vůbec nalezen (Joy a kol. 1991). Histochemická detekce škrobu byla doplněna také jeho přímým stanovením v pozdních fázích maturace (5. – 8. týden), které potvrdilo pokles obsahu škrobu na konci maturace. Tento pokles však nebyl tak dramatický, jako při histochemické detekci. Tento nesoulad byl pravděpodobně vyvolán tím, že akumulace škrobu je spojena s vývojovými poškozeními (Svobodová a kol. 1999), které se na konci maturace vyskytovaly poměrně často. Proto je možné, že dobře vyvinutá nepoškozená embrya obsahují nižší množství škrobu, než bylo detekováno pomocí HPLC ve smíšeném vzorku embryí.

Studovali jsme také dynamiku obsahu nestrukturních sacharidů během maturace, kdy byl do média přidán PEG v koncentraci 3,75 %, neboť z předchozí studie (Svobodová a kol. 1999) bylo zřejmé, že toto ošetření má pozitivní vliv na vývoj

somatických embryí. Celkový obsah sacharidů byl nižší, zvýšil se však poměr sacharosy ku hexosám. Stasolla a kol. (2003) pozorovali po aplikaci PEG snížení hladin transkriptů mnoha enzymů účastnících se katabolismu sacharosy. U kontrolních embryí rostoucích bez přítomnosti PEG se naopak hladiny těchto transkriptů zvyšovaly. Autoři se domnívají, že proto tato embrya nedosáhla fyziologické zralosti. Inhibiční efekt PEG na předčasné klíčení (Attree a kol. 1991) pak připisují právě změnám v sacharidovém metabolismu.

Další zvýšení koncentrace PEG v maturačním médiu na 7,5 % vedlo k výrazným změnám v obsahu sacharidů, a to jak ve srovnání s kontrolní variantou, tak i ve srovnání s variantou s 3,75% PEG. V průběhu 4. a 5. týdne maturace došlo k výraznému zvýšení obsahu sacharosy i hexos (Lipavská a kol. 2000). To může být dáno výskytem vývojových poškození pozorovaných na anatomické úrovni v pozdních fázích maturace (Svobodová a kol. 1999). Jednotlivé embryogenní linie navíc reagují rozdílně na různé koncentrace PEG (Vágner a kol. 2005b), proto je těžké vyvodit konkrétní zobecnění.

Jednotlivé embryogenní kultury se liší i schopností reagovat na přítomnost ABA v médiu. Výše popisovaný genotyp AFO 541 (Svobodová a kol. 1999, Lipavská a kol. 2000) patří mezi kultury s vysokou embryogenní kapacitou, tj. s velkou schopností vytvářet embrya po aplikaci ABA. Další embryogenní kultury *Picea abies* odvozené v naší laboratoři podle protokolu popsaneého v práci Vágner a kol. (2005a) se však ve schopnosti reagovat na exogenně dodanou ABA velmi lišily.

Obecný mechanismus působení ABA v rostlinách není jasný, neboť zatím nebyly popsány žádné receptory pro ABA (Finkelstein a kol. 2002). Bylo však popsáno mnoho mutantů se změněnou reakcí na ABA, většina z nich u *Arabidopsis thaliana*. Mezi ně patří též *abi* (abscisic acid insensitive) mutantní rostliny, které mají nezměněnou hladinu endogenní ABA, avšak na ABA nereagují (Giraudat 1995). Byly popsány jako rostliny klíčící na koncentracích ABA, které za normálních okolností klíčení inhibují (Koorneef a kol. 1984). Fenotypový projev *abi3*, *abi4* a *abi5* mutantů je vázán na semena (Holdsworth a kol. 1999). *ABI3*, *ABI4* a *ABI5* geny kódují transkripční faktory, které společně regulují odpověď semen na ABA (Söderman a kol. 2000). Různé studie prokázaly, že *ABI3* transkripční faktor stojí na začátku signální dráhy přenosu ABA signálu (McCourt 1999, Lopez-Molina a kol. 2002). *ABI3* ortology byly izolovány z mnoha rostlinných druhů, např. z *Populus trichocarpa* (Rohde a kol. 1998), *Triticum aestivum* (Nakamura a Toyama

2001), *Chamaecyparis nootkatensis* (Lazarova a kol. 2002) a také z *Picea abies* (*PaVPI*; Footitt a kol. 2003).

Pro pochopení rozdílné senzitivity jednotlivých embryogenních linií na ABA jsme se rozhodli analyzovat expresi *PaVPI* genu v průběhu maturace vybraných kultur s kontrastní embryogenní kapacitou. Analýzu exprese *PaVPI* jsme doplnili anatomickou studií (Fischerová a kol., odesláno do tisku). Exprese *PaVPI* v neembryogenní kultuře nebyla detekována, a to ani po jejím přenesení na médium obsahující ABA. Tento přenos vedl k ukládání fenolických látek v kultuře a k jejímu postupnému odumírání. Ukládání fenolických látek je považováno za stresovou reakci (Gutmann a kol. 1996), jako stresový faktor u nediferencované neembryogenní kultury pravděpodobně působila vysoká koncentrace ABA v médiu.

Pro analýzu exprese *PaVPI* jsme dále vybrali dvě kontrastní embryogenní linie, lišící se schopností vytvářet embrya na maturačním médiu, a tedy možná i schopností reagovat na ABA. Zatímco AFO 541 je typickým zástupcem kultur s vysokou embryogenní kapacitou, embryogenní linie C203 má embryogenní kapacitu nízkou a embrya tvoří jen výjimečně (Vágner a kol. 2005b). Podle klasifikace Jalonen a von Arnold (1991) tedy C203 patří do skupiny B embryogenních kultur. Přenesení kultury C203 na maturační médium bylo spojeno se zvýšením exprese *PaVPI*, tato hladina zůstala nezměněna do 2. týdne maturace. Ve 3. týdně klesla a dále již nemohla být detekována, neboť nebylo možné izolovat RNA z kultury. Embryogenní kultura C203 reagovala na přenos na maturační médium nejprve dělením buněk v meristematických oblastech a zvětšením meristematických částí, následná kultivace na maturačním médiu však vedla k postupnému rozpadu kultury. Kultura si zachovávala charakter proembryogenní hmoty i na maturačním médiu. Jako proembryogenní hmota bývají označovány embryogenní kultury ve fázi proliferace (Filonova a kol. 2000a), přenos proembryogenní hmoty na maturační médium bývá spojen s tvorbou raných somatických embryí. Ta se od proembryogenní hmoty liší ustavením protodermu (Sabala a kol. 2000). U kultury C203 se však protoderm nezakládal ani po 3 týdnech maturace, není tedy možné u této linie hovořit o vývoji raných somatických embryí. Naproti tomu u kultury AFO 541 docházelo k ustavení protodermu již 2 týdny po přenosu na maturační médium (Svobodová a kol. 1999, Fischerová a kol. odesláno do tisku). Přenos této kultury na médium obsahující ABA byl spojen s nárůstem exprese *PaVPI*, hladina exprese se s postupným vývojem embryí zvyšovala, a to až

do 5. týdne maturace. Embrya v té době dosáhla kotyledonárního stádia vývoje, tj. byly založeny všechny vnitřní struktury embrya a začalo prorůstání děložních primordií. Poté došlo k prudkému poklesu exprese *PaVP1*. Stejný průběh exprese *PaVP1* v průběhu maturace vysoce embryogenní kultury *Picea abies* popisují i Footitt a kol. (2003) a byl popsán i u *Daucus carota* (Shiota a kol. 1998). Expresi *PaVP1* jsme popsali také u linie C110, další vysoce embryogenní kultury odvozené v naší laboratoři podle protokolu Vágner a kol. (2005a). Důvodem bylo potvrzení průběhu exprese *PaVP1* u další vysoce embryogenní kultury. Průběh exprese *PaVP1* byl u embryogenní linie C110 pěstované na maturačním médiu stejný jako u linie AFO 541. Pokud však byla po dvou týdnech maturace odstraněna ABA z média, exprese *PaVP1* se rychle snížila a raná somatická embrya se začala rozpadat. Není však zřejmé, zda byl rozpad embryí primárně ovlivněn absencí ABA v médiu či snížením exprese *PaVP1*, neboť samo snížení exprese *PaVP1* mohlo souviset buďto s nepřítomností ABA v médiu či s rozpadem embryí, ve kterých k expresi dochází (Footitt a kol. 2003). Jelikož ke snížení exprese *PaVP1* docházelo i za přítomnosti ABA v médiu, a to u rozpadajících se embryí linie C203, je možné spekulovat, že exprese *PaVP1* je podmíněna jak přítomností ABA v médiu, tak přítomností vyvíjejících se meristemických center. Zvyšující se expresi *PaVP1* je tedy možno považovat za marker správného vývoje somatických embryí.

4.3. Desikace a klíčení

Desikace je významnou etapou somatické embryogeneze, která ovlivňuje úspěšnost klíčení. Ve všech experimentech jsme použili systém desikace popsán v práci Vágner a kol. (2005a). Na anatomické úrovni jsme nenalezli žádné výrazné rozdíly mezi zralými embryi na konci maturace a embryi vystavenými desikaci, pouze došlo k zahuštění cytoplasmy buněk povrchových vrstev embrya. V průběhu desikace se však v somatických embryích začaly akumulovat sacharidy rafinosové řady (RFO: rafinosa, stachyosa a verbascosa; Kumstýřová a kol. 2000). Ve zralých zygotických embryích *Picea abies* také dochází k akumulaci RFO (Gösslová a kol. 2001). Předpokládá se, že RFO mohou bránit krystalizaci sacharosy, a tím zvyšovat odolnost embryí k vysoušení (Lipavská a Konrádová 2004). U zygotických embryí slouží RFO rovněž jako zdroj uhlíku a energie v raných fázích klíčení (Downie a Bewley 2000).

Vlastní klíčení somatických embryí je tedy výrazně ovlivněno předchozími fázemi somatické embryogeneze. Často diskutovanou otázkou je vliv použití osmotika v průběhu maturace na úspěšnost klíčení somatických embryí. Find (1997) ukázal, že 5% PEG 4000 negativně ovlivňoval prorůstání kořene a vývoj apikální části somatických embryí *Picea abies*. Ke stejnému závěru došli i Bozhkov a von Arnold (1998) při použití 7,5 a 2,5% PEG. V našich experimentech se však počet klíčících embryí po aplikaci 3,75% PEG v průběhu maturace zvýšil. Koncentrace 7,5 % naopak počet klíčících embryí snížila (Svobodová a kol. 1999). Možným vysvětlením je rozdílná citlivost jednotlivých embryogenních linií na různé koncentrace PEG (Vágner a kol. 2005b). Högberg a kol. (2001) prokázali, že negativní vliv PEG vymizel v průběhu růstu rostlin ze somatických embryí v *ex vitro* podmínkách.

5. ZÁVĚRY

- Vývoj somatických embryí probíhající na maturačním médiu lze na anatomické úrovni rozdělit do čtyř vývojových stádií lišících se různým stupněm vnitřní diference: stádium raných somatických embryí, cylindrické stádium, stádium prekotyledonární a stádium kotyledonární.
- U embryí kultivovaných na maturačním médiu po dosažení kotyledonárního stádia dochází k rozpadu kořenové čepičky a vývojovým poruchám, spojeným s ukládáním polyfenolických látek a škrobu.
- Časová posloupnost jednotlivých vývojových stádií maturace somatických embryí je ovlivněna působením PEG 4000, při použití 3,75% PEG se celý proces maturace zrychlí až o dva týdny ve srovnání s maturací probíhající na médiu bez PEG. Zvýšená koncentrace PEG (7,5%) vede ke vzniku prasklin v hypokotylu somatických embryí.
- Obsah nestrukturních sacharidů v embryogenní kultuře rostoucí na maturačním médiu se s jejím vývojem zvyšuje, a to díky zvyšujícímu se obsahu sacharosy v embryích. Obsah hexos v embryích je nízký.
- PEG 4000 v koncentraci 3,75 % v maturačním médiu zvyšuje poměr sacharosy ku hexosám v somatických embryích, celkový obsah sacharidů v embryogenní kultuře mírně snižuje. Přidání 7,5 % PEG do maturačního média vede ke změnám v obsahu a dynamice ukládání nestrukturních sacharidů, embrya obsahují hexosy ve větší míře než embrya pěstovaná bez, či s 3,75% PEG.
- Celkový počet vyvinutých embryí se u většiny testovaných linií zvýší zařazením pre-maturační fáze (na médiu bez růstových regulátorů) mezi proliferaci a maturaci. Podobný efekt má kultivace embryogenních kultur na prámčích s polypropylenovou membránou, která zároveň zkracuje dobu nutnou k jejich vývoji.

- Byl vytvořen vzorový protokol pro práci s embryogenními kulturami smrku ztepilého od fáze indukce až po převod do *ex vitro* podmínek, včetně postupu kryoprezervace.
- Expze genu pro transkripční faktor PaVP1 je detekovatelná jen v embryogenních liniích, bez ohledu na jejich schopnost tvořit zralá embrya. V neembryogenní kultuře není expze *PaVP1* detekovatelná.
- Expze *PaVP1* je u embryogenních linií indukována přenesením na maturační médium obsahující ABA. Vynechání ABA v průběhu maturace vede k rychlému vymizení expze *PaVP1* a také k poškození vývoje embryí.
- U linie s nízkou embryogenní kapacitou je zvýšení expze *PaVP1* po přenesení na maturační médium pouze přechodné. Následný pokles expze *PaVP1* je spojen s rozpadem meristematických center.
- V liniích s vysokou embryogenní kapacitou se udržuje expze *PaVP1* v průběhu maturace na vysoké hladině s maximem v kotyledonárním stádiu vývoje embryí.
- *PaVP1* sonda specificky hybridizuje se dvěma transkripty odlišné délky, jejichž vzájemný poměr se v průběhu vývoje embryogenních kultur mění. To indikuje možnost regulace syntézy PaVP1 proteinu alternativním sestřihem.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aronen T.S., Krajňáková J., Haggman H.M., Ryynanen L.A. (1999). Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science* **142**, 163-172
- Attree S.M. a Fowke L.C. (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **35**, 1 – 35
- Attree S.M., Moore D., Sawhney V.K. a Fowke L.C. (1991). Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) somatic embryos: effects of a non-plasmolyzing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany* **68**, 519–525
- Attree S.M., Pomeroy M.K. a Fowke L.C. (1992). Manipulation of condition for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta* **187**, 395 – 404
- Attree S.M., Pomeroy M.K. a Fowke L.C. (1995). 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**, 433 – 439
- Barrett J.D., Park Y.S. a Bonga J.M. (1997). The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **16**, 411 – 415
- Beardmore T. a Charest P. J. (1995). Black Spruce Somatic Embryo Germination and Desiccation Tolerance. I. Effects of Abscisic-Acid, Cold, and Heat- Treatments on the Germinability of Mature Black Spruce Somatic Embryos. *Canadian Journal of Forest Research* **25**, 1763-1772
- Becwar M.R., Nagmani R. a Wann S.R. (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* **20**, 810 – 817
- Berger F. (1999). Endosperm development. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 28–32
- Bomal C. a Tremblay F. M. (1999). Effect of desiccation to low moisture content on germination, synchronization of root emergence, and plantlet regeneration of black spruce somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **56**, 193-200
- Bomal, C. a Tremblay F. M. (1999). Effect of desiccation to low moisture content on germination, synchronization of root emergence, and plantlet regeneration of black spruce somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **56**, 193-200
- Bornman C.H. (1993). Micropropagation and somatic embryogenesis. *In: Plant breeding: Principles and Prospects*. Chapman & Hall, London
- Bozhkov P.V. a von Arnold S. (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum* **104**, 211 – 224
- Bozhkov P.V., Ahn I.S. and Park Y.G. (1997). Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. *Canadian Journal of Botany* **75**, 509 – 512
- Bozhkov P.V., Filonova L.H. a von Arnold S. (2002). 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**, 658-667
- Bozkov P.V. (1995). Genotypic and media factors affecting stabilization of polyembryogenic cultures in norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant Cell Reports* **14**, 389 – 392
- Carrier D.J., Cunningham J.E., Taylor D.C. a Dunstan D.I. (1997). Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. *Plant Cell Reports* **16**, 550 – 554
- Chalupa V. (1985). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Communicationes Instituti Forestalis Čechosloveniae* **14**, 57 – 63

- Ciavatta V.T., Egertsdotter U., Clapham D., von Arnold S. a Cairney J. (2002). A promoter from the loblolly pine *PtNIP1;1* gene directs expression in an early-embryogenesis and suspensor-specific fashion. *Planta* **215**, 694-698
- Cyr D. R., Lazaroff W. R., Grimes S. M. A., Quan G., Bethune T. D., Dunstan D. I. a Roberts D. R. (1994). Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Reports* **13**, 574-577
- Cyr D.R. (1999). Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. In: Somatic embryogenesis of woody plants, vol. 4, Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (eds.), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht/Boston/London, 239-262
- Downie B. a Bewley D. (2000). Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiologia Plantarum* **110**, 1-12
- Dunstan D.I., Bekkaoui F., Pilon M., Fowke L.C. a Abrams S.R. (1988). Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant science* **58**, 77-84
- Dyachok J., Tobin A., Price N. a von Arnold S. (2000). Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Reports* **19**, 290-297
- Dyachok J., Wiweger M., Kenne L. a von Arnold S. (2002). Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. *Plant Physiology* **128**, 523-533
- Egertsdotter U. a von Arnold S. (1993). Classification of Embryogenic Cell-lines of *Picea abies* as Regards Protoplast Isolation and Culture. *Journal of Plant Physiology* **141**, 222 – 229
- Egertsdotter U. a von Arnold S. (1995). Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* **93**, 334 – 345
- Egertsdotter U. a von Arnold S. (1998) Development of somatic embryos in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* **49**: 155–162
- Filonova L., Bozhkov P. a von Arnold S. (2000a). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* **51**, 249–264
- Filonova L., Bozhkov P., Brukhin, V., Daniel G., Zhivotovsky B. a von Arnold S. (2000b). 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
- Find J.I. (1997). Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, dessication and germination. *Plant science* **128**, 75 – 83
- Finer J.J., Kriebel H.B. a Becwar M.R. (1989). Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Plant Cell Reports* **8**, 203 – 206
- Finkelstein R.R., Gampala S.S.L. a Rock C.D. (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *Plant Cell* S15-S45
- Fischerová L., Fischer L., Vondráková Z. a Vágner M. (odesláno do tisku). Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in Norway spruce embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos.
- Flinn B.S., Roberts D.R. a Taylor I.E.P. (1991). Evaluation of somatic embryos of interior spruce. Characterization and developmental regulation of storage proteins. *Physiologia Plantarum* **82**, 624 – 632
- Flinn B.S., Roberts D.R., Newton C.H., Cyr D.R., Webster F.B. a Taylor I.E.P. (1993). Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* **89**, 719 – 730
- Footitt S., Ingouff M., Clapham D. a von Arnold S. (2003). Expression of the viviparous 1 (*Pavp1*) and p34cdc2 protein kinase (*cdc2Pa*) genes during somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst). *Journal of Experimental Botany* **54**, 1711-1719

- Fourre J. L., Berger P., Niquet L. a Andre P. (1997). Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: Morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 159-169
- Fowke L.C., Attree S.M. a Rennie P.J. (1994). Scanning electron microscopy of hydrated and desiccated mature somatic and zygotic embryos of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.). *Plant Cell Reports* **13**, 612 – 618
- Galerne M., Bercetche J. a Dereuddre J. (1992). Cryoconservation of embryogenic callus of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) - influence of different factors on callus recovery and on embryo and plantlet production. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Letres Botaniques* **139**, 331-344
- Giraudat J. (1995). Abscisic acid signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 232-238
- Gösslová M., Svobodová H., Lipavská H., Albrechtová J. a Vreugdenhil D. (2001). Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **37**, 20-28
- Gutmann M., von Aderkas P., Label P. a Lelu M.-A. (1996). Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1905 – 1917
- Hakman I. (1993). 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
- Hakman I. a Fowke L.C. (1987). Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce). *Canadian Journal of Botany* **65**, 656 – 659
- Hakman I. a von Arnold S. (1988). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce). *Physiologia Plantarum* **72**, 579 – 587
- Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. a Eriksson T. (1985). The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* **38**, 53 – 59
- Harada J.J. (1999). Signaling in plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 23–27
- Högberg K.-A., Bozhkov P.V., Gronroos R. a von Arnold S. (2001). Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **16**, 295-304
- Högberg K.-A., Ekberg I., Norell L. a von Arnold S. (1998). Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 1536 – 1545
- Holdsworth M., Kurup S. a McKibbin R. (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science* **4**, 275-280
- Ingouff M., Farbos I., Lagercrantz U. a von Arnold S. (2001). *PaHBI* is an evolutionary conserved HD-GL2 homeobox gene expressed in the protoderm during Norway spruce embryo development. *Genesis* **30**, 220-230
- Iraqi D. a Tremblay F. M. (2001). 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**, 2301–2311
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F. M. a Bousquet J. (1993). RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) Bsp. *Theoretical and Applied Genetics* **86**, 81-87
- Jalonen P. a von Arnold S. (1991). Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Reports* **10**, 384 – 387
- Jasik J., Salajová T. a Salaj J. (1995). Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryos in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Protoplasma* **185**, 205 – 211
- Johnson R.W., Asokanathan P.S. a Griffith M. (1997). Water and sucrose regulate canola embryo development. *Physiologia Plantarum* **101**, 361 – 366

- Joy IV R.W., Yeung E.C., Kong L. a Thorpe T.A. (1991). Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **27**, 32 – 41
- Karssen C., Brinkhorst-van der Swan D., Breekland A., and Koorneef M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**, 158-165
- Kiyosue T., Satoh S., Kamada H. a Harada H. (1993). Somatic Embryogenesis of Higher Plants. *Journal of Plant Research* **3**, 75 – 82
- Klimaszewska K. a Smith D.R. (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum* **100**, 949-957
- Kong L. a Yeung E.C. (1995). Effect 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
- Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J. a Vreugdenhil D. (2002). Sucrose metabolism during embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* **159**, 387-396
- Koorneef M., Reuling G. a Karssen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **61**, 377-383
- Korlach J. a Zoglauer K. (1995). Developmental patterns during direct somatic embryogenesis in protoplast cultures of european larch (*Larix decidua* Mill.). *Plant Cell Reports* **15**, 242 – 247
- Krogstrup P., Eriksen E.N., MØller J.D. a Roulund H. (1988). Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Plant Cell Reports* **7**, 594 – 597
- Kumstýřová L., Vágner M., Lipavská H. a Gösslová M. (2000). Somatic embryogenesis of Norway spruce: anatomical characterization and content of non-structural saccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* **38** (Suppl.), 43, posterová presentace
- Lazarova G., Zeng Y. a Kermode A.R. (2002). Cloning and expression of an *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3* (*ABI3*) gene homologue of yellow-cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*). *Journal of Experimental Botany* **53**, 1219-1221
- Le V.Q., Belles-Isles J., Dusabenyagasani M. a Tremblay M.F. (2001). An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2089-2095
- Lelu M.-A. a Label P. (1994). Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiologia Plantarum* **92**, 53 – 60
- Lelu M.-A., Bastien C., Dugeault A., Gouez M.-L. a Klimaszewska K. (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* **105**, 719-728
- Lelu M.A., Klimaszewska K. a Charest P. (1994). Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Canadian Journal of Forest Research* **24**, 100-106
- Lipavská H. a Konrádová H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **40**, 23-30
- Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Vágner M. a Vondráková Z. (2000). Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **36**, 260-267
- Lopes M.A. a Larkins B.A. (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* **5**, 1383–1399
- Lopez-Molina L., Mongrand S., McLachlin D.T., Chait B.T. a Nam-Hai Chua (2002). *ABI5* acts downstream of *ABI3* to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal* **32**, 317-328

- Maraschin S.F., de Priester W., Spaink H.P. a Wang M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1711–1726
- Mathieu M., Lelu-Walter M. A., Blervacq A. S., David H., Hawkins S. a Neutelings G. (2006). Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Molecular Biology* **61**, 615–627
- McCourt P. (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 219-243
- Misra S. a Green M. J. (1990). Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. I. Seed proteins and protein body composition of mature embryo and the megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss). *Plant Science* **68**, 163-173
- Mo L.H. a von Arnold S. (1991). Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Plant Physiology* **138**, 223 – 230
- Mo L.H., Egertsdotter U. a von Arnold S. (1996). Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Annals of Botany* **77**, 143-152
- Nagmani R. a Bonga J.M. (1985). Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research* **15**, 1088 – 1091
- Nagmani R., Diner A.M., Garton S. a Zipf A.E. (1995). Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers. In: Somatic embryogenesis in woody plants *Vol.1*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 23 – 48
- Nakamura S. a Toyama T. (2001). Isolation of a *VPI* homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars. *Journal of Experimental Botany* **52**, 875-876
- Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K. a Kikuta Y. (2000). Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carotta* L.) seedlings in culture. *Planta* **211**, 756-759
- Nkongolo K. K. a Klimaszewska K. (1994) Karyotype analysis and optimization of mitotic index in *Picea mariana* (black spruce) preparations from seedling root tips and embryogenic cultures. *Heredity* **73**, 11-17
- Nkongolo K. K. a Klimaszewska K. (1995). Cytological and molecular relationships between *Larix decidua*, *L. leptolepis* and *Larix x eurolepis* - Identification of species specific chromosomes and synchronization of mitotic cells. *Theoretical and Applied Genetics* **90**, 827-834
- Norgaard J. V., Duran V., Johnsen O., Krogstrup P., Baldursson S. a von Arnold S. (1993). Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell- lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Canadian Journal of Forest Research* **23**, 2560-2567
- Owens J.N. a Molder M. (1979). Sexual reproduction of white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany* **57**, 152-169
- Owens J.N., Simpson S.J., Molder M. (1982). Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development. *Canadian Journal of Botany* **60**, 2071-2083
- Park Y. S., Pond S. E. a Bonga J. M. (1994). Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*) - genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 742-750
- Pond S. E., Von Aderkas P. a Bonga J. M. (2002). Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **38**, 334-341
- Pullman G.S., Johnson S., van Tassel S. a Zhang Y. (2005). 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

- Pullman G.S., Namjoshi K. a Zhang Y. (2003a). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate and cytokinin adjustment. *Plant Cell Reports* **22**, 85-95
- Pullman G.S., Webb D.T. (1994). An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development. In: TAPPI R&D Div. Biol. Sci. Symp. TAPPI Press, Atlanta, 31–34
- Pullman G.S., Zhang Y. a Phan B.H. (2003b). Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports* **22**, 96-104
- Quiroz-Figueroa F.R., Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R.M. a Loyola-Vargas V.M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **86**, 285–301
- Reinert J. (1958). Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften* **45**, 344 – 345
- Roberts D.R. (1991). Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* **83**, 247 – 254
- Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T., Webster F.B. a Sutton B.C.S. (1989). Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **8**, 285 – 288
- Roberts D.R., Flinn B.S., Webb D.T., Webster F.B. a Sutton B.C.S. (1990). Abscisic 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
- Rohde A., Ardiles-Diaz W., Van Montagu M. a Boerjan W. (1998). Isolation and expression analysis of an *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3* (*ABI3*) homologue from *Populus trichocarpa*. *Journal of Experimental Botany* **49**, 1059-1060
- Ruaud J.N., Bercetche J. a Pacques M. (1992). 1st evidence of somatic embryogenesis from needles of 1- year old *Picea abies* plants. *Plant Cell Reports* **11**, 563-566
- Sabala I., Elfstrand M., Farbos I., Clapham D. a von Arnold S. (2000). Tissue-specific expression of *Pal8*, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology* **42**, 461–478
- Salajová T., Jasik J., Kormuťák A., Salaj J. a Hakman I. (1996). Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica*, and *Abies alba* x *Abies numidica*). *Plant Cell Reports* **15**, 527 – 530
- Salajová T., Salaj J., Jasik J. a Kormuťák A. (1995). Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol.3, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 207 – 220
- Shiota H., Satoh R., Watabe K., Harada H. a Kamada H. (1998). *C-ABI3*, the carrot homologue of the *Arabidopsis ABI3*, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant and Cell Physiology* **39**, 1184-1193
- Silveira D., Floh E.I.S., Handro W. a Guerra M.P. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**: 53–60
- Singh H. (1978). *Embryology of gymnosperms*. Berlin: Borntrager
- Skriver K. a Mundy J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* **2**, 503 – 512
- Soderman E.M., Brocard I.M., Lynch T.J. a Finkelstein R.R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling network. *Plant Physiology* **124**, 1752-1765
- Stasolla C. a Yeung E.C. (1999). Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **35**, 316-319

- Stasolla C., Loukanina N., Ashihara H., Yeung E.C. a Thorpe T.A. (2001a). Purine and pyrimidine metabolism during the partial drying treatment of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum* **111**, 93-101
- Stasolla C., Loukanina N., Ashihara H., Yeung E.C. a Thorpe T.A. (2001b). Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiology* **21**, 359-367
- Stasolla D., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W. a Sederoff R.R. (2003). The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* **131**, 49-60
- Steward F.C., Mapes M.O. a Mears K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* **45**, 705 – 708
- Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Lipavská H., Vágner M. a Vondráková Z. (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 209-221
- Taurus T.E., Fowke L.C. a Dunstan D.I. (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany* **69**, 1873 – 1899
- Treat W.J., Engler C.R. a Soltes E.J. (1989). Culture of photomixotropic soybean and pine in a modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnology and Bioengineering* **34**, 1191 – 1202
- Tremblay L. a Tremblay F.M. (1991). Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **27**, 95 – 103
- Tremblay L. a Tremblay F.M. (1995). Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**, 39 – 46
- Vágner M., Fischerová L., Špačková J. a Vondráková Z. (2005). Somatic embryogenesis in Norway spruce. In: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Eds. Jain S.M. and Gupta P.K., Springer, Netherlands, 141-155
- Vágner M., Vondráková Z., Fischerová L. a Opatrná J. (2005). Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as a compromise between liquid and solidified media. In: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Eds. Hvoslef-Eide A.K. and Preil W., Springer, Netherlands, 295-302
- Vágner M., Vondráková Z., Strnadová Z., Eder J. a Macháčková I. (1998). Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. *Advances in Horticultural Sciences* **12**, 11 – 18
- Van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., Van Kammen A. a De Vries S.C. (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* **125**: 1880–1890
- Von Arnold S. a Hakman I. (1988). Regulation of Somatic Embryo Development in *Picea abies* by Abscisic Acid (ABA). *Journal of Plant Physiology* **132**, 164 – 169
- Von Arnold S., Clapham D.H., Egertsdotter U., Ekberg I., Mo L.H. a Yibrah H.S. (1995a). Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*), In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed 1, Bajaj Y.P.S. (ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 415-430
- Von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H. a Norgaard J. (1995b). Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol.3, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 17 – 36
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. a Filonova L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**, 233–249
- Vooková B. a Kormuťák A. (2001). Effect of sucrose concentration, charcoal, and indole-3-butyric acid on germination of *Abies numidica* somatic embryos. *Biologia Plantarum* **44**, 181-184

- Vooková B., Gajdošová A. a Matúšová R. (1998). Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids. *Biologia Plantarum* **40**, 523 – 530
- Watad A.A., Kochba M., Nissim A. a Gaba V. (1995). Improvement of *Aconitum napelus* micropropagation by liquid culture on floating membrane rafts. *Plant Cell Reports* **14**, 345-348
- Weber L., Borisjuk L. a Wobus U. (1997). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* **2**, 169–174.
- Wenck A.R., Quinn M., Whetten R.W., Pullman G. a Sederoff R. (1999) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Molecular Biology* **39**, 407–416
- West M.A.L. a Harada J.J. (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* **5**, 1361–1369
- Wiweger M., Farbos I., Ingouff M., Lagercrantz U. a von Arnold S. (2003). Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2691-2699
- Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**, 1411–1423

7. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

- Vágner M., Vondráková Z., Opatrná J., **Kumstýřová L.**, Gösslová M., Svobodová H., Eder J., Macháčková I., Chalupa V. (1999): Endogenous IAA and cytokinins during somatic and zygotic embryo development of Norway spruce. *Biol. Plant.* 42 (Suppl.), S 60.
- Vágner M., Vondráková Z., Opatrná J., Špačková J., **Kumstýřová L.**, Gösslová M., Svobodová H., Albrechtová J., Cvikrová M., Vaněk T., Macháčková I., Chalupa V. (1999): Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous phytohormone levels as the markers of embryo development? *Proc. COST 822, WG 2*, pp. 36-37.
- Vágner M., **Kumstýřová L.**, Vondráková Z., Eder J., Gösslová M., Svobodová H., Albrechtová J., Macháčková I., Chalupa V. (2000): Endogenous IAA and cytokinins in Norway spruce somatic and zygotic embryogenesis. *PPB 38, supp. August 2000*, p.42
- **Kumstýřová L.**, Vágner M., Lipavská H., Gösslová M. (2000): Somatic embryogenesis of Norway spruce: Anatomical characterization and content of non-structural saccharides. *PPB 38, supp. August 2000*, p.43. Poster awarded **STUDENT POSTER AWARD**.
- Svobodová H., Lipavská H., Albrechtová J., **Kumstýřová L.**, Gösslová M. (2000): Carbohydrate metabolism during somatic and zygotic embryogenesis of Norway spruce. *PPB 38, supp. August 2000*, p.43
- Vágner M., Vondráková Z., **Kumstýřová L.**, Opatrná J., Cvikrová M., Eder J., Vaněk T., Macháčková I. (2000): Norway spruce somatic embryogenesis. *Proc. COST 843, WG 2 Meeting*, (July 2000, Tampere, Finland) pp.15-16.
- Albrechtová J., Gösslová M., **Kumstýřová L.**, Vágner M., Svobodová H., Lipavská H. (2000): Somatická embryogeneze smrku ztepilého: I. Základní charakterizace procesu maturace a srovnání s vývojem zygotických embryí v odpovídajících fázích. Konference „Zachování a reprodukce genových zdrojů lesních stromů“, ČZU Praha 24.11. 2000, pp. 3-4.
- **Kumstýřová L.**, Lipavská H., Vágner M., Albrechtová J., Svobodová H. (2000): Somatická embryogeneze smrku ztepilého: V. Změny v sacharidovém spektru u embryí u embryí vystavených desikačnímu působení. Konference „Zachování a reprodukce genových zdrojů lesních stromů“, ČZU Praha 24.11. 2000, pp. 27-28.
- Vágner M., **Kumstýřová L.**, Vondráková Z., Eder J., Macháčková I., Chalupa V. (2000): Endogenous IAA, ABA and cytokinins during somatic and zygotic embryogenesis of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). Konference „Zachování a reprodukce genových zdrojů lesních stromů“, ČZU Praha 24.11. 2000, pp. 41-43.
- **Kumstýřová L.**, Vágner M., Vondráková Z., Eder J., Opatrná J., Macháčková I. (2001): Endogenous phytohormones and anatomy of Norway spruce somatic embryos during desiccation and germination. *Proc.17th International Conference on Plant Growth Substances (1. – 6. 7. 2001, Brno, Czech Republic)* p.117
- **Kumstýřová L.**, Lipavská H., Vágner M. (2001): Desiccation and germination of Norway spruce somatic embryos (oral presentation). *Proc. Plant Physiology Days of Young Scientists 2001 (10. – 11. 7. 2001, Praha, Czech Republic)* p.7
- **Kumstýřová L.**, Lipavská H., Vágner M. (2001): Desiccation and germination of Norway spruce somatic embryos. *IXth Days of Plant Physiology, České Budějovice 17.-21. 9. 2001, Book of abstracts*, p 81.
- Vágner M., **Kumstýřová L.**, Opatrná J., Vondráková Z. (2001): Norway spruce somatic embryogenesis: Bottlenecks of the method. *Proc. COST 843, WG 2, Thessaloniki, (22.-25.9. 2001)* pp. 28-29.
- Vágner M., **Kumstýřová L.**, Opatrná J., Vondráková Z. (2001): Somatic embryogenesis of Norway spruce: A potent tool for micropropagation? *Proc. 1st Int. Symp. on „Accclimatization and Establishment of Micropropagated Plants“*, Sani, 19.-22..9. 2001, p. 48.
- Vágner M., Vondráková Z., **Kumstýřová L.**, Opatrná J. (2001): Somatická embryogeneze jehličnanů. Konference „Nové poznatky z fyziologie a ekologie lesních dřevin“, 21. 3. 2001, Akademie Věd, Praha, pp.2-3

- Vágner M., Vondráková Z., Špačková J., **Kumstýřová L.**, Opatrná J. (2001): Somatic embryogenesis u smrku ztepilého: kultivace na pevných a tekutých médiích. Konference ČZU, prosinec 2001, pp 25-27.
- Vondráková Z., Opatrná J., **Kumstýřová L.**, Vágner M. (2001): Somatic embryogenesis of *Abies alba*. Konference ČZU, prosinec 2001, pp.28-32.
- **Kumstýřová L.**, Vágner M., Vondráková Z., Lipavská H. (2002): Characterization of desiccation and germination phase of Norway spruce somatic embryogenesis. Proc. 13th FESPP Congress (2. – 6. 9. 2002, Hersonissos, Greece) p.317
- Vondráková Z., Opatrná J., **Kumstýřová L.**, Vágner M. (2002): The development of early somatic embryos of *Abies cephalonica*. Proc. 13th FESPP Congress (2. – 6. 9. 2002, Hersonissos, Greece) p. 325
- Vágner M., Vondráková Z., **Kumstýřová L.**, Opatrná J. (2002): Norway spruce somatic embryogenesis: Membrane rafts as compromise between liquid and solidified media. Proc. COST 843 Meeting, As, Norway, May 2002, pp. 33-34.
- **Fischerová L.**, Vágner M., Vondráková Z., Eder J., Macháčková I. (2003): Somatic and zygotic embryogenesis of Norway spruce: Anatomical study and phytohormones in developing embryos. Proc. Embryogenesis and development regulation in plants (6.-7. 3. 2003, Torino, Italy) p. 94
- **Fischerová L.**, Vágner M., Vondráková Z., Macháčková I. (2003): Expression of ABI3 homologue in embryogenic lines of Norway spruce. Proc. 7th Int. Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, June 23-28, 2003, p. 49
- Vondráková Z., Opatrná J., **Fischerová L.**, Vágner M., Macháčková I. (2003): The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. IXth International Congress on Plant Embryology „Plant Reproduction: From Mendel to Molecular Biology“, Brno, September 1-3, 2003, Books of abstracts, p.113.
- Špačková J., **Fischerová L.**, Vondráková Z., Zámečník J., Vágner M. (2003): Cryopreservation of Norway spruce embryogenic cultures. Proc. COST 843 Meeting, Sanremo, (27. - 29.11. 2003) pp. 31-32.
- **Fischerová L.**, Fischer L., Vondráková Z., Vágner M. (2004): Expression of ABI3 homologue PaVP1 in Norway spruce embryogenic lines. 9th International Symposium on Plant Seeds: Seeds in the -omics era, Gatersleben, May 15-19, 2004, Book of abstracts, p.79
- Vičánková A., Vondráková Z., **Fischerová L.**, Vágner M., Macháčková I. (2004): Immunolocalization of cytokinins in Norway spruce somatic embryos. Acta Physiologiae Plantarum 26, No.3 Suppl., p.27
- Vágner M., Vondráková Z., Vičánková A., **Fischerová L.**, Malbeck J. (2004): Endogenous cytokinins in Norway spruce somatic embryogenesis: LC/MS detection and immunolocalization *in situ*. Proc. COST 843 Meeting, Debrecen (9.-11. 9. 2004).
- Vágner M., Vondráková Z., **Fischerová L.**, Vičánková A., Malbeck J. (2005): Endogenous phytohormones during Norway spruce somatic embryogenesis. Proc. COST 843 and 851 Action, Stará Lesná (28.6. – 3.7.), pp. 162-164.
- Vágner M., Špačková J., Eliášová K., **Fischerová L.** and Vondráková Z (2007): Cryopreservation of Norway spruce embryogenic cultures. COST 871 Meeting, Oviedo, Spain, April 2007.