

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie rostlin



Somatická embryogeneze jehličnanů: metabolismus a role RFO

Bc. Ondřej Skala

diplomová práce

Praha 2009

Školitel: Doc. RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Konzultanti: RNDr. Hana Konrádová, PhD. a Mgr. Martin Kubeš

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma

„Somatická embryogeneze jehličnanů: metabolismus a role RFO“

vypracoval samostatně pod vedením Doc. RNDr. Heleny Lipavské, PhD., RNDr. Hany Konrádové, PhD. a Mgr. Martina Kubeše s využitím citované literatury na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 až 2009. Souhlasím s případným zapůjčením práce pro studijní a vědecké účely.



Be. Ondřej Skala

Na tomto místě bych rád poděkoval:

- Doc. RNDr. Heleně Lipavské, PhD. za odborné vedení práce, četné inspirativní konzultace a především za cenné připomínky k rukopisu. Děkuji jí za veskrze přátelský přístup a nezdolnou trpělivost.
- RNDr. Haně Konrádové, PhD. za cenné rady, kritické připomínky k části literárního úvodu a konzultace.
- Mgr. Martinu Kubešovi za konzultace a za trpělivé zasvěcení do experimentálních a analytických metod.
- Mgr. Nikole Drážné za uvedení do laboratorní práce s kulturami *in vitro*.
- RNDr. Terezii Salajové, CSc. za laskavé poskytnutí embryogenní kultury AN72 a cenné rady týkající se somatické embryogeneze jedle.
- RNDr. Zuzaně Vondrákové za laskavé poskytnutí embryogenní kultury AFO 541.
- Mgr. Lukáši Hudcovi za cenné rady týkající se problematiky somatické embryogeneze jedle.
- Všem členům týmu laboratoře 007 za vše.
- Všem členům Katedry Fyziologie rostlin za příjemné pracovní prostředí.
- Paní Olze Činglové

a v neposlední řadě děkuji svým rodičům

Použité zkratky

ABA	kyselina abscisová
AGP	arabinogalaktanové proteiny
ESM	embryonálně-suspensorová hmota
DGJ	1-deoxygalaktonojirimycin
GolS	galaktinolsyntáza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LEA proteiny	„late embryogenesis abundant” proteiny
PEG	polyetylen glykol
PMM	pevné maturační médium
RFO	oligosacharidy rafinózové řady
RFS	rafinózasyntáza
RH	relativní vzdušná vlhkost
ROS	reaktivní formy kyslíku
R/S	poměr oligosacharidů rafinózové řady ku sacharóze
SE	somatické(á) embryo(a)
SEZ	somatická embryogeneze
STS	stachyózasyntáza
SuSy	sacharózasyntáza
TAG	triacylglyceroly
TMM	tekuté maturační médium
ZE	zygotické(á) embryo(a)
ZEZ	zygotická embryogeneze

Abstract

Raffinose series oligosaccharides (RFOs= α -1,6-galaktosyl_n-sach; $1 \leq n < c. 7$) represent a prominent part of soluble saccharide content in mature conifer seeds. RFOs are considered to act as the multifunctional components in plants, but their precise functions in specific physiological processes remain contentious. The present study focuses on the metabolism and role of RFOs in somatic embryogenesis in two conifer species- *Picea abies* and hybrid fir (*Abies alba* x *numidica*). Three basic approaches were set for achieving spruce somatic embryos (SE) with diverse levels of RFOs: a) culture cultivation with exogenous RFOs, b) culture cultivation with precursors of RFOs synthesis and the last c) culture exposition to variegated postmaturation treatments inducing RFOs synthesis (desiccation/cold stress). Parallel combinations of stresses led to the highest RFOs levels in SE. These findings associate the RFOs levels in spruce SE with protective function within desiccation state. The final levels of RFOs in the spruce SE were also regulated by endogenous levels of myo-inositol. RFOs were rapidly degraded by SE within early phases of germination independently of the initial level of RFOs. No dramatic decrease in embryo germination was found in embryos with decreased RFOs degradation achieved by treatment with Deoxygalactonojirimicin- the specific inhibitor of α -galactosidases. Results did not support the idea the higher the initial RFOs levels, the better the course of SE germination. In fir somatic embryogenesis, the soluble saccharide spectrum dynamics differed from the spruce one. The main difference was in the timing of RFOs accumulation. The fir embryogenic culture cumulated the RFOs in high levels since the beginning of maturation phase and the levels as well as the dynamics of the other soluble saccharides were dependent on the saccharide type (maltose or sucrose) in the maturation media. Maltose supported the cumulation of RFOs over the maturation phase and sucrose during postmaturation treatment. In conclusion for different conifer species no common characteristics of RFOs profiles and conditions and factors controlling RFOs accumulation as well as simple relationship between RFOs level and germination efficiency can be found.

Abstrakt

Oligosacharidy rafinóзовé řady (RFO= α -1,6-galaktozyl_n-sach; $1 \leq n < \text{cca } 7$) představují kvantitativně jednu z nejvýznamnějších složek rozpustných sacharidů u zralých semen jehličnanů. RFO zastávají u rostlin zřejmě vícero funkcí, ale jejich úloha v určitých fyziologických procesech zůstává nejasná. Předkládaná práce se zaměřuje na metabolismus a role RFO během somatické embryogeneze u dvou druhů jehličnanů- *Picea abies* a hybridu *Abies alba x numidica*. Pro získání somatických embryí smrku s rozdílnými hladinami RFO byly stanoveny tři základní přístupy: a) kultivace kultury s exogenně dodaným RFO b) kultivace kultury s prekurzory syntézy RFO c) vystavení kultury pozměněným postmaturačním ošetřením, která indukovala syntézu RFO (desikační/chladové ošetření). Nejvyšších hladin RFO bylo dosaženo paralelní aplikací stresových faktorů, což spojuje úlohu RFO v případě somatických embryí smrku s ochrannou funkcí během desikovaného stavu. Výsledná hladina RFO u somatických embryí smrku byla také regulována endogenní hladinou myo-inozitolu. RFO byly embryi smrku zdegradovány v nejranějších fázích klíčení bez ohledu na jejich počáteční hladinu. Somatická embrya, u nichž byla snížena rychlost degradace RFO během klíčení aplikací Deoxygalaknojirimycinu (specifický inhibitor α -galaktozidáz), nevykazovala změny v průběhu klíčení. Výsledky nepodpořily předpoklad, že vyšší počáteční hladina RFO u embryí by vedla ke zlepšení průběhu klíčení embryí. U somatické embryogeneze hybridu jedle byla dynamika spektra endogenních rozpustných sacharidů odlišná. Lišila se především v načasování kumulace RFO. Embryogenní kultura jedle kumulovala RFO ve vysokých hladinách již od počátku fáze zrání embryí. Hladina RFO i dynamika ostatních rozpustných sacharidů byla závislá na typu dodaného sacharidu do maturačního média (maltóza/sacharóza). Maltóza podporovala kumulaci RFO v průběhu zrání, kdežto sacharóza během postmaturačních ošetření. Zdá se proto, že pro různé druhy jehličnanů nebude možné nalézt společné charakteristiky profilů RFO a podmínek a faktorů, které kontrolují kumulaci RFO, a také prostý vztah mezi hladinou RFO a úspěšností klíčení embryí.

Obsah

1. ÚVOD	1
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	3
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
2.1. Fáze somatické embryogeneze jehličnanů	4
2.2. Faktory regulující zrání somatických embryí jehličnanů	4
2.2.1. ABA.....	5
2.2.2. Osmotikum.....	5
2.2.3. Sacharidy.....	6
2.2.4. Extracelulární látky.....	7
2.3. Akumulace zásobních látek během zrání SE jehličnanů	8
2.3.1. Zásobní proteiny.....	9
2.3.2. Lipidy.....	9
2.3.3. Škrob.....	10
2.3.4. Rozpustné sacharidy.....	10
2.4. Metabolismus oligosacharidů rafinózové řady u rostlin	11
2.4.1. Biosyntéza RFO.....	12
2.4.2. Degradace RFO.....	14
2.4.3. Faktory ovlivňující hladiny RFO v rostlinné buňce.....	14
2.4.3.1. <i>Aktivita galaktinolsyntáz</i>	15
2.4.3.2. <i>Regulace syntézy RFO hladinami příslušných substrátů</i>	15
2.4.3.3. <i>Ovlivnění syntézy RFO syntézou ostatních galaktozylcyklitolů</i>	16
2.5. Postmaturační ošetření SE konifer, kumulace RFO	16
2.5.1. Tolerance k desikaci.....	17
2.5.1.1. <i>Indukce tolerance k desikaci u SE jehličnanů</i>	17
2.5.1.2. <i>Mechanismy tolerance desikace u semen</i>	18
2.5.1.3. <i>Biochemické změny vyvolané postmaturačními ošetřeními u SE konifer</i>	22
2.5.1.4. <i>Kumulace RFO v semenech konifer</i>	23
2.6. Klíčení somatických embryí jehličnanů	24
2.6.1. Imbibice.....	24
2.6.2. Nárůst metabolické aktivity.....	25
2.6.3. RFO jako osmotikum a zdroj osmotika.....	26

3. MATERIÁL A METODY	27
3.1. Somatická embryogeneze smrku ztepilého (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.)	27
3.1.1. Rostlinný materiál.....	27
3.1.2. Kultivace.....	27
3.1.2.1. Udržování kultury.....	27
3.1.2.2. Zrání kultury.....	28
3.1.2.3. Postmaturační ošetření.....	30
3.1.2.4. Klíčení somatických embryí.....	30
3.2. Zygotická embryogeneze smrku ztepilého (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.)	31
3.2.1. Rostlinný materiál.....	31
3.2.2. Sterilizace.....	32
3.2.3. Klíčení.....	32
3.3. Somatická embryogeneze jedle (hybrid <i>Abies alba</i> x <i>A. numidica</i>)	32
3.3.1. Rostlinný materiál.....	32
3.3.2. Kultivace.....	32
3.3.2.1. Udržování kultury.....	32
3.3.2.2. Zrání kultury.....	34
3.3.2.3. Postmaturační ošetření.....	34
3.3.2.4. Klíčení somatických embryí.....	34
3.4. Odběr materiálu	35
3.5. Extrakce sacharidů	35
3.6. Stanovení obsahu a spektra sacharidů	36
3.7. Hodnocení klíčících rostlin	36
3.8. Měření přírůstku klíčících somatických embryí po aplikaci inhibitoru DGJ	37
3.9. Statistické zpracování dat	37
3.10. Přehled experimentů	38
4. VÝSLEDKY	42
4.1. Dynamika RFO v průběhu somatické embryogeneze smrku ztepilého	42
4.1.1. Kumulace RFO u SE během kultivace na maturačních médiích.....	42
4.1.1.1. Kultivace SE v pozdních fázích zrání na médiích obsahujících RFO.....	42
4.1.1.2. Kultivace SE v pozdních fázích zrání na médiích obsahujících prekurzory syntézy RFO.....	43

4.1.2. Kumulace RFO u SE během postmaturačních ošetření	51
4.2.1.1. Standardní ošetření pomalou desikací.....	51
4.2.1.2. Desikační ošetření při 97% relativní vzdušné vlhkosti.....	51
4.2.1.3. Chladové ošetření.....	55
4.2.1.4. Tepelný šok.....	59
4.2.1.5. Kombinace postmaturačních ošetření.....	60
4.1.3. Klíčení somatických embryí.....	66
4.1.3.1. Třítýdenní klíčení SE na germináčním médiu standardního složení.....	66
4.1.3.2. Aplikace DGJ- zpomalení katabolizmu RFO v raných fázích klíčení SE smrku ztepilého.....	70
4.2. Klíčení semen smrku ztepilého.....	76
4.2.1. Aplikace DGJ- zpomalení katabolizmu RFO v raných fázích klíčení semen smrku ztepilého.....	76
4.3. Dynamika RFO v průběhu somatické embryogeneze jedle (hybrid <i>Abies alba</i> x <i>A. numidica</i>).....	79
5. DISKUZE.....	86
5.1. Somatická embryogeneze smrku ztepilého.....	86
5.2. Somatická embryogeneze jedle (hybrid <i>Abies alba</i> x <i>Abies numidica</i>).....	96
6. ZÁVĚRY.....	102
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	104

1. Úvod

Zanedlouho uplyne právě čtvrt století, co byl poprvé představen vývoj embryí jehličnanu ze somatických buněk *in vitro* (*Picea abies* - Chalupa, 1985; Hakman a von Arnold, 1985; Hakman et al., 1985). Od té doby byl proces somatické embryogeneze více či méně úspěšně navozen u mnoha druhů jehličnanů, a byla tak odhalena široká druhová a genotypová variabilita požadavků jehličnanů v tomto procesu. Základní schéma průběhu somatické embryogeneze jehličnanů zůstává pro všechny druhy obdobné. Somatická embryogeneze jehličnanů představuje proces po sobě jdoucích kroků, ve kterých jsou mezi jednotlivými kroky vyžadovány odlišné, často protichůdné podmínky. Toto sériové uspořádání procesu také způsobuje, že kvalita průběhu fáze předešlé výrazně ovlivňuje fázi následnou. Také z tohoto důvodu se mnoho prací zabývá především studiem počátečních fází procesu. Přejít z fáze zrání, během které se somatické embryo vyvíjí, získává svůj konečný tvar, ukládá zásobní látky, do fáze klíčení, představuje důležitý a zjevně energeticky velice náročný přechod mezi dvěma výrazně odlišnými sporofytickými fázemi vývoje rostliny. Pokrok v somatické embryogenezi jehličnanů nám tak postupně umožňuje nahlédnout do procesů embryogeneze těchto rostlin. Nelze zapomenout na skutečnost, že proces somatické embryogeneze jehličnanů má a jistě bude mít široké praktické využití v lesním hospodářství. Jedná se o vysoce produktivní a ekonomicky výhodný vegetativní způsob množení rostlin. Uplatní se tak v zachování a znovurozšíření kriticky ohrožených druhů jehličnanů i jako metoda vedoucí k získání životaschopných jedinců s genově manipulovaným pozadím. Pro vysokou výtěžnost kvalitních somatických embryí synchronně zrajících a klíčících, schopných postupného přechodu z heterotrofního způsobu výživy na autotrofní a následného vývoje v dospělou konkurenceschopnou rostlinu, je důležité znát markery určující „zralost“ embryí. Nejprve bylo snahou přiblížit morfologii SE morfologii ZE. Ukázalo se, že tento přístup poskytuje určité indície vypovídající o průběhu zrání embryí, ale naznačuje relativně málo o zralosti embrya a jeho následném vývoji (Klimaszewska et al., 2004). Poněkud Lepším markerem je podobnost biochemická- např. hladiny jednotlivých sacharidů a jejich dynamika v průběhu zrání embryí (Lipavská et al., 2000a, Iraqi a Tremblay, 2001b), kvantita i kvalita zásobních látek (Hakman et al., 1990; Attree et al., 1992; Misra et al., 1993; Hakman, 1993; Gösslová et al., 2001), nebo například rychlost utilizace exogenní ABA (Kong & von Aderkas, 2007). Carpenter et al (2000) se domnívají, že vhodným markerem zralosti SE jehličnanů (ale především rodu *Pinus*) je hladina oligosacharidů rafinosové řady (RFO) a dehydrinů, přičemž zvýšená hladina RFO má za následek zlepšení průběhu klíčení. Zásadní odlišnost podmínek, ve kterých se zygotická a

somatická embrya vyvíjejí ovšem hodnocení významu jednotlivých biochemických markerů značně ztěžuje. Přesné určení role jednotlivých látek, včetně nestrukturních sacharidů, při somatické embryogenezi jehličnanů zůstává tedy stále předmětem studia.

Cíle diplomové práce

- ❖ **Přispět k objasnění role RFO v průběhu somatické embryogeneze smrku ztepilého a hybridu jedle (*Abies alba* x *Abies numidica*)**

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

- **Ovlivnit endogenní hladiny RFO**
 - dodáním RFO kultuře v pozdních fázích zrání
 - manipulací s hladinami prekurzorů syntézy RFO v médiu během zrání
 - vystavením různým postmaturačním ošetřením
- **Testovat vliv zvýšené endogenní hladiny RFO somatických embryí na průběh klíčení**
- **Testovat vliv pozměněného průběhu degradace RFO v raných fázích klíčení somatických embryí na průběh klíčení**

Somatická embryogeneze hybridu jedle (*Abies alba* x *A. numidica*)

- **Charakterizovat dynamiku endogenních rozpustných sacharidů v průběhu celého procesu**
- **Testovat vliv typu dodaného sacharidu do maturačního média na:**
 - změny dynamiky obsahu a spekter endogenních rozpustných sacharidů v průběhu celého procesu
 - výtěžnost maturace

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Fáze somatické embryogeneze jehličnanů

Proces somatické embryogeneze (SEZ) konifer je obecně dělen do několika po sobě jdoucích kroků (von Arnold a Hakman, 1988; Stasolla et al., 2002). Na rozdíl od rostlin krytosemenných, začíná SEZ konifer odvozením embryonálně suspenzorové hmoty (ESM), a to nejčastěji z hypokotylu zygotických embryí (ZE) nacházejících se v různých vývojových stádiích, která jsou často specifická pro jednotlivé rody konifer (Stasolla et al., 2002). Odvozená ESM již obsahuje vyvinutá somatická proembrya, která se dále dělí štěpením (Attree a Fowke, 1993). Pro indukci ESM jsou specifické cytokininy téměř vždy ve spojení s auxiny a v kombinaci s nízkou hladinou sacharózy. ESM je v následné- tj. udržovací fázi za stejných podmínek, nebo za podmínek velice podobných, jako při indukci- množena. Dále může být zařazena prematurační fáze, ve které je ESM kultivována na médiu neobsahujícím růstové regulátory (např. Taber et al., 1998; Schuller et al., 2000). Během fáze zrání (maturace) SE dochází k vývoji morfologických struktur SE a ukládání zásobních látek. (Stasolla et al., 2002). Pro navození zrání proembryí jehličnanů je esenciální aplikace ABA do média spojená s absencí růstových regulátorů v médiu specifických pro fáze předešlé (Attree a Fowke, 1993, Label a Lelu, 2000; Stasolla et al., 2002). Následuje postmaturační ošetření (desikační či chladové), které již neovlivňuje vývoj SE na úrovni morfologické (embryo má již konečnou podobu), ale navozuje prospěšné změny na biochemické úrovni, které vedou ke zlepšení průběhu posledních fází tj. klíčení SE a následné konverze v rostlinu v podmínkách *ex vitro*. V průběhu SEZ konifer se optimální průběh kroku předchozího výrazně odráží v krocích následných a projevuje se na kvalitě i kvantitě výsledné produkce SE (Stasolla et al., 2002)

Tato práce se zabývá zráním SE, ale je zaměřena především na konečné fáze zrání a fáze následné. Detailní informace týkající se fází předešlých zde neuvádím a zájemce bych rád odkázal na práce svých předchůdců (Hudec, 2002; Grigová, 2003; Kubeš, 2004; Ulrychová, 2004; Drážná, 2006).

2.2. Faktory regulující zrání somatických embryí jehličnanů

Proces somatické embryogeneze jehličnanů je navozován a dále regulován působením mnoha vnějších faktorů. Mnohé z nich stále neznáme, ale nejvýznamnější, z doposud

poznanych, jsou růstové regulátory (viz. souhrnný článek Stasolla et al., 2002), sacharidy aplikované do media (Jain et al., 1995) a osmotický stres (Attree a Fowke, 1995).

2.2.1. ABA

V průběhu SEZ většiny druhů jehličnanů je aplikace ABA do média esenciální pro navození dalšího vývoje proembryí přítomných v prolifерující ESM (Attree a Fowke, 1993; Gutmann et al., 1996; Label a Lelu, 2000; Stasolla et al., 2002). Zdrojem ABA pro vyvíjející se ZE v semeni je především megagametofyt a také mateřská rostlina (*Picea glauca*- Kong et al., 1997). Mnohé publikace prokazují, že ABA navyšuje počet i kvalitu zralých SE (kvalitu především z hlediska indukce akumulace zásobních látek) a celý proces SEZ synchronizuje (von Arnold a Hakman, 1988; Hakman a von Arnold, 1988; Roberts et al., 1990; Attree a Fowke, 1993; Kong a Yeung, 1995; Label a Lelu, 2000). Také zabraňuje předčasnému klíčení SE na maturačním médiu (Roberts et al., 1990), podílí se na indukci některých mechanismů tolerance dehydratace rostlinných pletiv (viz kap. 2.5.1.2.) a výskytu polyembryonie během zrání (Attree a Fowke, 1993).

ABA je v SEZ jehličnanů aplikována v koncentracích od 1-100 μM (Attree a Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002). Takto široký interval je dán tím, že se dokonce i embryogenní linie stejného druhu mohou lišit ve svém požadavku na exogenně aplikovanou koncentraci ABA (Jalonen a von Arnold, 1991; Thompson a von Aderkas, 1992). Byla také prokázána přímá úměra mezi mírami utilizace exogenní ABA embryogenními liniemi *Picea glauca* x *engelmannii* a embryogenních potenciálů embryogenních linií (Kong a von Aderkas, 2007). Pozitivní vliv na průběh zrání SE některých druhů jehličnanů má postupné snižování koncentrace ABA v maturačním médiu během zrání, ať už vlivem dodání nižšího množství ABA do média nebo aplikací látek ABA absorbujících (Pullman et al., 1991, 2005; Carpenter et al., 2000).

2.2.2. Osmotikum

Mnohé pokusy o zdokonalení kultivačních protokolů SEZ konifer poukazují na pozitivní vliv působícího osmotika v maturačním médiu na zrající kulturu. Dnes je v SEZ konifer nejčastěji aplikován polyetylglykol (PEG o $M_r > 4000$), který patří mezi vysokomolekulární osmotika, tedy taková, která nepenetrují do buňky. Jimi lze navodit dlouhodobý a obdobný vodní stres, který působí při přirozené desikaci semen (Attree a Fowke, 1993). Nevýhodou druhé skupiny osmotik- penetrujících, je skutečnost, že způsobují plasmolýzu (Attree a Fowke

1993) a nemusejí být po vstupu do buňky zcela inertní, někdy jsou dokonce přirozenou součástí buňky, a to může vést k problémům při interpretaci dat (Lipavská a Konrádová, 2004).

PEG má často pozitivní vliv jak na kvantitu uzrálých SE (Kong a Yeung, 1995, Vooková et al., 1998; Salaj et al., 2004), tak často přibližuje kvantitativně i kvalitativně uložené zásobní látky SE k ZE (Attree et al., 1992, Attree a Fowke, 1995; Misra et al., 1993; Grigová et al., 2007). Osmotický stres může také zabránit předčasnému klíčení SE v pozdních fázích zrání (Attree et al., 1991; Roberts, 1991a; Misra et al., 1993) a může mít vliv na výslednou hladinu ABA v embryích (Kong a Yeung, 1995; Find, 1997). Snížený osmotický potenciál a ABA ovlivňují některé procesy zrání nezávisle (Skriver a Mundy, 1990; Attree et al., 1993), ale silně ovlivňují zrání SE právě ve své součinnosti (Misra et al., 1993; Leal et al., 1995; Attree a Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002). Například jejich působení při potlačení předčasného klíčení SE *Picea glauca* je považováno za synergické (Attree a Fowke, 1995).

Přestože aplikace PEGu do média působí často pozitivně v průběhu zrání SE, ne vždy jsou pozitivně ovlivněny i následné fáze SEZ (*Picea glauca* (Kong a Yeung, 1995), *Picea abies* (Find, 1997; Bozhkov a von Arnold, 1998)). Reakce na ošetření PEGem se může lišit, nebo být dokonce protichůdná u různých genotypů jednoho druhu jehličnanu (Ramarosandratana et al., 2001). Je proto nutné určit vhodné koncentrace PEG pro jednotlivé genotypy.

2.2.3. Sacharidy

S mohutným nárůstem počtu druhů jehličnanů, u kterých byla SEZ v posledních letech představena, se potvrzuje, že sacharidy obsažené v médiu výrazně ovlivňují celý proces SEZ. Pro jednotlivé kroky SEZ konkrétního druhu jehličnanu mohou být optimální různé druhy sacharidů v různých koncentracích (např. Schuller et al., 2000). Během zrání je požadavek SE na druh sacharidu u jednotlivých druhů jehličnanů výrazně variabilnější oproti fázím předešlým a následným, kdy je obvykle aplikována sacharóza. Druh a koncentrace sacharidu, případně jeho hydrolýza kulturou přímo v médiu, jako v případě sacharózy, může ovlivnit výslednou hladinu zásobních látek zralých SE (Iraqi a Tremblay, 2001a). Také pozitivní vliv aplikovaného PEGu do maturačního média hybridu *Abies alba* x *A. numidica* byl závislý na použitém druhu sacharidu v médiu (Salaj et al., 2004).

Koncentrace aplikovaných sacharidů do media, například sacharózy, se pohybují zpravidla v rozmezí od 1 % do 6 % (Lipavská a Konrádová, 2004). Sacharóza je stále nejčastěji aplikovaným sacharidem do médií v SEZ. To platí zejména pro dlouhodobě zkoumaný rod *Picea*. Jinak je tomu u rodu *Abies*, kde existuje relativně vysoká druhová variabilita v preferenci

sacharidů pro optimální zrání SE (maltóza- např. *Abies nordmaniana* (Nørgaard, 1997); hybrid *Abies alba x Abies mumidica* (Salaj et al., 2004); laktóza- (*Abies alba*- Schuller a Reuther, 1993; Schuller et al., 2000)). Maltóza je stále častěji používaným sacharidem v maturačním médiu SEZ konifer, a to nejen u druhů rodu *Abies*, ale i dalších (např. *Chamaecyparis obtusa* (Taniguchi et al., 2004); *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2005); *Pinus nigra* (Salajová et al., 1999); *Pinus taeda* (Carpenter et al., 2000; Pullman et al., 2003)). Preference maltózy by mohla být dána její možnou pomalejší hydrolýzou oproti situaci u sacharózy (Scott et al., 1995). Nørgaard (1997) se domnívá, že rychlý metabolismus sacharózy může vést u některých kultur až k hypoxii a následné kumulaci etanolu, a tím působit toxicky. Jinou hypotézu zastávají Blanc et al. (2002), kde vlivem pomalé hydrolýzy by nižší hladina hexóz mohla být biochemickým faktorem orientujícím metabolismus směrem k SEZ.

Přestože správný výběr sacharidu je pro průběh SEZ esenciální, zůstává zatím neznámo, jakými mechanismy tyto sacharidy vývoj SE ovlivňují. To je také dáno multifunkčností sacharidů v rostlinách. V první řadě slouží SE jako zdroj energie a uhlíkových skeletů. Také představují signální molekuly, které jsou schopné aktivovat složitou signální transdukční síť, která ovlivňuje expresi genů v embryích, a tím usměrňuje průběh SEZ (více viz. Skala, 2006). Sacharidy mají funkci osmotika a jsou jednou z ochranných složek při protekci buněčných struktur embryí v průběhu desikace a v jiných situacích, kdy dochází k poklesu obsahu vody v pletivech. (viz kap. 2.5.1.2.)

2.2.4. Extracelulární látky

Arabinogalaktanové proteiny, ale i enzymy (β -1,3-glukanasy; thaumatiny, invertasy) jsou sekretovány z buněk kultury a výrazně ovlivňují vývoj embryí. Arabinogalaktanové proteiny (AGP) představují skupinu na hydroxyprolin bohatých proteoglykanů přítomných v buněčné stěně, plazmatických membránách a během kultivace se uvolňují do média (více Rumyantseva, 2005). Ovlivňují buněčné dělení, dlouhivý růst buněk (Showalter, 2001) a také diferenciaci buněk (Kreuger a van Holst, 1993). Aplikace extrahovaných AGPs z média, na němž je kultivována kultura s vysokým embryogenním potenciálem, nebo ze semen může zvýšit embryogenní potenciál jiné kultury (*Daucus carota*- Kreuger a van Holst, 1993; van Hengel et al., 2001; *Picea abies*- Egertsdotter a von Arnold, 1993, 1995).

AGP mohou být substráty pro chitinázy (štěpení vazby β -1,4-N-acetyl-D-glukosamin). Právě oligosacharidy odštěpené od AGP chitinásami by mohly být signálními molekulami pozitivně ovlivňující SEZ (van Hengel et al., 2001). Chitinázy mohou také štěpit rhizobiální

Nod faktory (Staehein et al., 1994) a jiné lipo-chito-oligosacharidy (LCOs) (Dyachok et al., 2002). U embryogenních kultur smrku ztepilého byla prokázána sekrece lipofilních molekul s nízkou molekulární hmotností (pravděpodobně LCOs) sensitivních k chitinázám (Dyachok et al., 2002). Například Nod faktory podporují časně fáze SEZ *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1998; Dyachok et al., 2000), kde mohou nahradit úlohu auxinu a cytokininu ve stimulaci buněčného dělení (Dyachok et al., 2000).

Iraqi et al. (2005) zjistili, že zrající embryogenní kultura *Picea mariana* uvolňuje do média protein schopný štěpení sacharózy na hexózy s molekulární hmotností blízkou apoplastické invertase. V předchozí práci Iraqi a Tremblay (2001a) u *Picea mariana* a *Picea glauca* zjistili, že zmíněná hydrolýza sacharózy v médiu má pravděpodobně za následek vyšší výtěžek embryí se zvýšenou hladinou zásobních proteinů s následnou vyšší frekvencí klíčení. Domnívají se, že sacharóza a její hydrolýza v médiu generují signál, který zvyšuje expresi genů vedoucí ke kumulaci zásobních proteinů.

Vše tedy naznačuje tomu, že látky uvolňované kulturou do média signalizují nebo se na produkci signálu podílejí a výrazně ovlivňují SEZ. Významnou roli by zde mohly hrát chitinázy, u nichž byla prokázána úzká korelace mezi vývojovým stádiem SE a exprese specifických chitináz (Mo et al., 1996; Dyachok et al., 2002). Také vzhledem k dynamice AGPs během vývoje embryí lze předpokládat i zde vývojovou regulaci (van Hengel et al. 2002).

2.3. Akumulace zásobních látek během zrání SE jehličnanů

Produktem fáze zrání SEZ konifer jsou zralá SE morfologicky odpovídající ZE, která by měla mít dostatečné množství uložených zásobních látek. Semena konifer ukládají své zásobní látky převážně ve formě lipidů (triacylglycerolů= TAG) v lipidových (Attree a Fowke, 1993; Grigová et al., 2007) a proteinů v proteinových (Hakman., 1993a; Misra et al., 1993; Misra, 1994) těliscích. Dále v menší míře ve formě škrobu (Joy et al., 1991) a rozpustných sacharidů (Downie a Bewley, 2000). Podobná situace je i u SEZ. K ukládání zásobních látek dochází v průběhu a především v pozdějších fázích zrání SE (Stasolla et al., 2002).

Cílem experimentátorů je dosažení SE s adekvátními hladinami zásobních látek a jejich složením jako u ZE (Attree a Fowke 1991; Attree et al., 1992). Nejdůležitějším zásobním orgánem semene konifer je megagametofyt, bez něhož např. extirpovaná ZE *Picea glauca* či *Pinus radiata* na médiu bez sacharózy nejsou schopna klíčit (Carrier et al., 1997; Lin a Leung, 2002a,b). SE se musejí s absencí megagametofytu, ač snahou experimentátorů je alespoň některé jeho funkce složením media nahradit, vyrovnat. Hladiny zásobních látek vztahované na

jednotku suché hmotnosti embrya mohou být u SE i ZE stejné, absolutní hodnoty často vzhledem k několikanásobné velikosti SE oproti ZE jsou vyšší, což může vést k částečné kompenzaci absence megagametofytu u SE. Zásobní látky jsou využívány během klíčení, které pro embryo představuje energeticky velice náročný proces. Během zrání SE nedochází pouze ke kumulaci zásobních látek, ale je pro ně charakteristická určitá dynamika (Vooková et al., 1998; Stasolla et al., 2002, Grigová et al., 2007).

2.3.1. Zásobní proteiny

Studie zásobních proteinů mnoha druhů konifer odhalily, že proteinová tělíska obsahují proteinovou matrix (= ve vodě rozpustné proteiny) a dále ve vodě nerozpustné krystalické a globulární proteiny (Attree a Fowke, 1993; Misra 1994). Krystalické proteiny patří mezi hlavní zásobní proteiny semen konifer (Attree a Fowke, 1993; King a Gifford, 1997; Brownfield et al., 2007). Obsahují proteiny ze skupiny leguminů s molekulární hmotností okolo 55 kDa, které se skládají nejméně ze dvou podjednotek o 35 kDa a 22 kDa vázaných sulfidickou vazbou. Někdy mohou být přítomny podjednotky o 42 a < 14 kDa (Hakman et al., 1990; Misra a Green, 1991; Hakman, 1993; Misra 1994). Semena smrku ztepilého obsahovala ještě malé množství proteinu o 28 kDa (Hakman, 1993). Dominantním rozpustným proteinem je protein 45-47 kDa (Misra 1994, Klimaszevska et al., 2004). Výjimku v čeledi *Pinaceae* představuje rod *Abies*, jehož semena nesyntetizují zmíněný protein o 55 kDa (Jensen a Chen 1991; Vooková et al., 1998). Jisté rozdíly v syntéze zásobních proteinů existují i mezi druhy v rámci rodu *Abies* (Kormuřák et al., 2006).

V zásobních proteinech semen mnoha druhů konifer je majoritní aminokyselinou arginin (King a Gifford, 1997; Silveira et al., 2004). Jeho přítomnost a metabolismus může sehrávat důležitou úlohu v regulaci klíčení (více např. Silveira et al., 2004).

2.3.2. Lipidy

Dalšími důležitými zásobními látkami semen konifer jsou lipidy- triacylglyceroly (TAG) (Feirer et al., 1989; Hakman et al., 1993a). Časný vývoj SE *Picea abies* je doprovázený nárůstem hladiny celkového obsahu lipidů s maximem v období formování děloh, poté dochází k poklesu hladiny (Grigová et al., 2007). Převážná část TAG je u semen konifer uložena v megagametofytu (*Pinus taeda* 80 %- Stone and Gifford, 1999; *Picea glauca* 90%- Attree et al., 1992). Přesto tvořily TAG až 40 % z hmotnosti sušiny ZE *Pinus taeda* (Stone a Gifford, 1999)

a 50% z čerstvé hmotnosti ZE *Picea abies* (Feirer et al., 1989). Attree a Fowke (1995) se domnívají, že úspěšně proběhne konverze takových SE konifer, která mají obsah vody mezi 10-32 % z čerstvé hmotnosti, hmotnost sušiny o 30-600 % a obsah lipidů o 50-700 % vyšší než ZE. Ukázalo se ovšem, že hladiny TAG u ZE *Picea abies* se značně liší mezi semeny z různých sezon (Grigová et al., 2007). Daleko stabilněji se chová druhové a poměrové zastoupení mastných kyselin v TAG, které je často podobné mezi SE a ZE (*Picea glauca*- Attree et al., 1992; *Picea glauca engelmannii* complex- Carrier et al., 1997; *Picea abies*- Grigová et al., 2007). Aplikace PEG během zrání SE *Picea abies* podobnost ještě prohlubuje (Grigová et al., 2007). Grigová et al. (2007) se domnívají, že poměry jednotlivých mastných kyselin jsou pro následný vývoj embryí významnější, nežli jejich konečná hladina.

2.3.3. Škrob

Škrob je polysacharid, který se začíná hromadit v embryích ze všech zásobních látek nejdříve (Stasolla et al., 2002). SE *Picea glauca* i *Picea mariana* kumulovala škrob především během prvních dvou týdnů zrání, poté se hladina škrobu již nenavýšovala (Iraqi a Tremblay, 2001b). U jiné embryogenní linie *Picea glauca* ukládala SE na rozdíl od ZE velká množství škrobu na úkor ostatních zásobních látek (Joy et al., 1991). Naopak během vývoje SE *Picea abies* představoval škrob menšinovou část spektra sacharidů s tendencí k poklesu v závěru zrání embryí. Vysokou hladinu škrobu zde vykazovala zralá SE nestandardního tvaru s tendencí ke kalusovatění (Lipavská et al., 2000a). U semen mnoha druhů konifer představuje škrob spíše minoritní složku zásobních látek (Misra, 1994).

2.3.4. Rozpustné sacharidy

Sacharóza

Sacharóza je považována za dočasnou formu zásobního sacharidu rostlinných buněk. V pozdějších fázích zrání SE se zvyšuje vakuolarizace buněk (Svobodová et al., 1999), v nichž je zásobní pool sacharózy u rostlin uskladněn (Pollock a Kingston-Smith, 1997). Právě vakuolarizace buněk by mohla být důležitou podmínkou kumulace sacharózy v izolovaných SE *Picea abies* (Lipavská et al., 2000a). Dynamika hladin sacharózy během zrání SE konifer je velmi výrazná. Ač je sacharóza převažujícím rozpustným sacharidem u zralých SE konifer, v raných fázích zrání SEZ je situace odlišná.

V raných fázích vývoje SE smrku převažuje mohutné buněčné dělení doprovázené diferenciací a tvorbou embryonálních struktur, pro které je typická vysoká aktivita invertáz doprovázená zvýšenou koncentrací hexóz (Iraqi a Tremblay, 2001b; Konrádová et al., 2002). Sacharózasyntáza (SuSy) – glykozyltransferáza katalyzující vratnou konverzi sacharózy ve fruktózu a UDP-glukózu za přítomnosti uridinfosfátu (UDP) (Sturm a Tang, 1999), v této fázi sehrává zřejmě méně důležitou úlohu oproti invertázám (Iraqi a Tremblay, 2001b). Posléze (po dvou týdnech zrání) dochází ke snížení aktivit invertáz na minimum za současného vzestupu aktivity SuSy lokalizované především v centru SE (Konrádová et al., 2002), či setrvání její aktivity na stejné hladině (Iraqi a Tremblay, 2001b). Zároveň dochází ke zvýšení poměru sacharóza:hexózy za současného snížení celkového obsahu sacharidů (Konrádová et al., 2002). U SE *Picea mariana* byla prokázána schopnost přijímat sacharosu během zrání přímo z média, ale význam příjmu na celkové hladině sacharózy v buňce u SE při reálném zrání SE určen nebyl (Iraqi et al., 2005). V médiu dochází během zrání SE smrku, ale i dalších konifer (*Pseudotsuga menziesii*- Taber et al., 1998) k rychlé hydrolyze sacharózy (Tremblay a Tremblay, 1995; Kubeš, 2004; Iraqi et al., 2005; Drážná, 2006) vlivem přítomných kyselých invertáz (Iraqi et al., 2005). Právě kvůli nízké koncentraci sacharózy v okolí SE (zbytková ESM) *Picea abies* Lipavská et al. (2000a) odhadují, že by výsledná koncentrace sacharózy v SE mohla být dána převážně resyntézou z přijatých hexóz.

Oligosacharidy rafinóзовé řady (?)

Invertázy mohou svojí aktivitou zasahovat také do metabolismu jiných neredukujících sacharidů s předpokládanou zásobní funkcí- oligosacharidů rafinóзовé řady (RFO) (Downie a Bewley, 2000), které jsou hlavním předmětem této práce. Ukázalo se, že RFO mohou být u některých SEZ konifer kumulovány již v závěru zrání (např. Carpenter et al., 2000). Jejich kumulace je však spojována především s působením postmaturačních ošetření na SE-desikačního (Bomal et al., 2002; Konrádová et al., 2003) či chladového na již zralá SE (Konrádová et al., 2003).

2.4. Metabolismus oligosacharidů rafinóзовé řady u rostlin

Oligosacharidy rafinóзовé řady (RFO) jsou běžně se vyskytující rozpustné sacharidy vyšších rostlin obsažené převážně v zásobních orgánech a semenech (Bachmann et al., 1994; Obendorf 1997; Muzguiz et al., 1998). Jedná se o skupinu derivátů sacharózy, na níž je v poloze α -1,6 navěšen různý počet galaktozylových zbytků (α -1,6-galaktozyl_n-sach; $1 \leq n <$

cca 7; rafinóza- n=1; stachyóza- n=2; verbaskóza- n=3; ajugóza- n=4) (Obendorf et al., 1997). V rostlině mohou existovat až tři na sobě relativně nezávislé pooly RFO- transportní, stresový a zásobní. RFO jsou transportované v některých rostlinách na dlouhé vzdálenosti (Lalonde et al., 2003; Hannah et al., 2006) a mohou být ukládány jako zásobní látky (Keller a Matile, 1985; Keller, 1992). Dále se zřejmě jedná o složku tolerance k desikaci (Downie a Bewley 2000, Bomal et al., 2002), chladu a mrazu mnohých rostlin (Hinesley et al., 1992; Bachman et al., 1994; Lipavská et al., 2000b; Konrádová et al., 2003).

2.4.1. Biosyntéza RFO

Potenciál syntézy RFO je patrně rozšířený skrze celou rostlinnou říši. Biosyntéza RFO začíná reverzibilním přenosem galaktozylového zbytku z vhodného donoru na molekulu sacharózy za vzniku rafinózy v přítomnosti rafinózasyntázy. Vyšší stupně RFO mohou být syntetizovány obdobně, a to postupným přenosem galaktozylových zbytků z vhodného donoru na již existující RFO za přispění příslušných galaktozyltransferáz (Keller a Pharr, 1996; Peterbauer a Richter 2001). Syntéza RFO za přímého využití UDP-galaktózy není u rostlin známa.

Nejčastějším donorem galaktózových (gal) zbytků pro syntézu RFO je galaktinol [O- α -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 1)-L-myo-inositol]. Tento cytoplazmatický galaktozylcyklitol myo-inositolové řady vzniká syntézou z myo-inositolu a UDP-galaktózy (Senser a Kandler, 1967) za katalýzy galaktinolsyntáz (GolS) (Liu et al., 1995; 1998). GolS jsou extravakuolární enzymy, zřejmě cytozolické (Bachman a Keller, 1995), které vyžadují ke své aktivitě přítomnost Mn^{2+} . GolS, jejichž počet je u různých rostlin rozdílný, patří mezi nejlépe prozkoumané enzymy podílející se na syntéze RFO. Na výsledné hladině galaktinolu v různých orgánech (Sprenger a Keller, 2000) a rozdílných ontogenetických stádiích rostliny mohou mít různý podíl aktivity jednotlivých golS (Liu et al., 1998?).

Rafinóza je syntetizována za účasti rafinózasyntáz (RFS) (Lehle a Tanner, 1973). RFS jsou nestabilní enzymy v podmínkách *in vitro*. I z tohoto důvodu patří k nejméně probádaným enzymům syntézy RFO (semena *Vicia faba*- Lehle a Tanner, 1973; *Ajuga reptans*- Bachman et al., 1994; Peterbauer et al., 2002a,b; *Oryza sativa*- Li et al., 2007). RFS jsou zřejmě cytozolické enzymy s pH optimem 6,5-7, které se pravděpodobně nepodílejí na syntéze vyšších stupňů RFO (Peterbauer a Richter, 2001).

Stachyózasyntázy (STS) (Peterbauer a Richter, 1998; Peterbauer et al., 1999) se kromě syntézy stachyózy mohou podílet i na syntéze vyšších stupňů RFO tzv. ping-pongovým mechanismem (Peterbauer et al., 2002b): syntéza stachyózy u semen hrachu zahrnuje

přechodnou formu enzymu (E-gal), kde je na STS navázán galaktozylový zbytek (Richter et al., 2000). Tato reakce, stejně jako všechny ostatní reakce syntézy RFO, je vratná (Haritatos et al., 1996). Pokud reakce syntézy stachyózy probíhá ve směru její degradace, vzniká E-gal, který je STS schopna navázat na jinou molekulu stachyózy za vzniku verbaskózy (Peterbauer et al., 2002b; 2003). Tato reakce je tedy (zdánlivě) na galaktinolu nezávislá a velmi připomíná GGT aktivitu viz. níže. pH optimum STS se pohybuje mezi 6,5-7. Podíl STS na hydrolyze RFO v raných fázích klíčení zůstává zatím nejasný (Peterbauer a Richter, 2001).

Ve vakuolách mezofylu *Ajuga reptans* byl nalezen enzym se schopností přenosu terminálního α -galaktozylového zbytku na jinou molekulu RFO (Bachman et al., 1994). Touto tzv. galaktan:galaktangalaktozyltransferázovou (GGT) aktivitou vzniká molekula RFO o jeden galaktozylový zbytek bohatší a druhá o jeden chudší, a to bez účasti galaktinolu. Tato aktivita je důležitá z hlediska představy, že galaktinol je považován za výlučně extravakuolární molekulu (Keller, 1992). Zmíněná aktivita byla doposud nalazena pouze v listech u rostlin z čeledi Lamiaceae (Bachman et al., 1994; Gilbert et al., 1997; Tapernoux-Lüthi et al., 2004, 2007), u nichž byly detekovány RFO nejvyšších řádů.

Vedle RFO se mohou v některých semenech, především luštěnin, vyskytovat ještě jiné α -galaktozidy- galaktozylcyklitoly. Syntéza galaktozylcyklitolů je analogická syntéze RFO, pouze výchozí molekulou, na kterou jsou navěšovány galaktozylové zbytky, není sacharóza, ale jeden z cyklitolů (myo-inositol (galaktinol je řazen do této skupiny sloučenin), D-pinitol, D-chiro-inositol, D-ononitol) (Obendorf, 1997). Galaktozylcyklitoly jsou zřejmě syntetizovány (metabolizovány) stejným setem enzymů jako RFO (Peterbauer a Richter, 1998; Peterbauer et al., 1998; Peterbauer a Richter, 2001; Lahuta et al., 2005 a,b, 2006; Ueda et al., 2005). GolS některých rostlin mohou využívat například D-chiroinozitol jako akceptor gal zbytku (Obendorf et al., 2004; Lahuta et al., 2005 a,b; Ueda et al., 2005) ale nikoli D-pinitolu či D-ononitolu. Syntézu příslušných galaktozylcyklitolů D-pinitolu a D-ononitolu mohou zprostředkovat některé RFS a STS, které mohou přenášet gal zbytky z galaktinolu na jiné cyklitoly (RFS na D-pinitol a D-ononitol (Peterbauer et al., 2002a); STS na D-pinitol, D-ononitol (Hoch et al., 1999; Richter et al., 2000; Obendorf et al., 2004; Lahuta et al., 2005a; Ueda et al., 2005) či sequyitol (Richter et al., 2000)). STS mohou pro syntézu stachyosy či digalaktozylcyklitolů místo galaktinolu využít jiné galaktozylcyklitoly jako donory gal zbytků (Peterbauer et al., 1998; Richter et al., 2000). Galaktinol je zřejmě hlavním zdrojem gal zbytků, ale v některých případech nemusí být tedy jediným. Toto vše může regulaci syntézy RFO značně zkomplikovat. Také u ZEZ konifer byla naměřena přítomnost D-pinitolu ve vyvíjejících se semenech *Picea*

abies (Gösslová et al., 2001) a *Pinus taeda* (Pullman a Buchanan, 2008), ale příslušný galaktozylcyklitol detekován nebyl.

2.4.2. Degradace RFO

Existují dvě možné cesty degradace RFO štěpící oligosacharidy z jejich opačných konců: 1) Postupná (exogenní) hydrolýza vazeb 1,6- kterými jsou α -galaktosylové zbytky v RFO vázány, je katalyzována α -galaktozidázami (tyto enzymy lze inhibovat 1-deoxygalaktonojirimycinem (DGJ) (Asano et al., 2000; Blöchl et al., 2007)); 2) vlivem aktivity β -fruktofuranozidáz s pH optimem rovným 4,5-5 (kyselé invertázy), které štěpí vazbu mezi molekulou fruktózy a glukózy v RFO a vyskytující se v buněčné stěně a vakuole (Sturm, 1999).

Podle pH optima lze rozdělit α -galaktozidázy na kyselé a alkalické. Jedná se o enzymy se širokou substrátovou specifikou štěpící α -galaktozidy v buňce (od rafinózy až po galaktomanany). α -galaktozidázy zajišťují degradaci RFO v raných fázích klíčení semen (Blöchl et al., 2008). Načasování exprese (přítomnost již ve zralém semeni x exprese až po imbibici semene) a příspěvek kyselých a alkalických α -galaktozidáz na degradaci RFO během klíčení se pravděpodobně liší v závislosti na anatomické stavbě semene a charakteru rozložení zásobních látek v něm a v ohledu na množství galaktomananů přítomných v buněčné stěně (Blöchl et al., 2008).

Následným krokem katabolizmu RFO je fosforylace produkované galaktózy galaktokinázami za vzniku galaktóza-1-P (Pazur et al., 1962). Galaktóza-1-P je metabolizován na UDP-galaktózu (více viz. Feusi et al., 1999; Dai et al., 2006), z níž cestou epimerázové reakce vzniká UDP-glukóza, tedy substrát důležitý např. v metabolismu buněčné stěny, nebo substrát pro SuSy (Sturm a Tang., 1999). UDP-glukóza může být případně přeměněna na glukózu-1-P. Vznikají tak dva hlavní substráty cukerného metabolismu (UDP-glukóza a glukóza-1-P) (Feusi et al., 1999).

2.4.3. Faktory ovlivňující hladiny RFO v rostlinné buňce

Hladina jakékoli látky v buňce je dána výší (rychlostí) její syntézy a degradace, importu a popřípadě jejího exportu. RFO se začínají obvykle kumulovat v pozdních fázích zrání semene. Samotné embryo je patrně syntézy RFO schopné, což dokazují mnohé práce zabývající se SEZ (Carpenter et al., 2000; Bomal et al., 2002; Konrádová et al., 2003). Faktorů, které navozují zvýšení hladiny RFO, je vícero, ale většinou se jedná o takové podmínky prostředí, při kterých je potřebná ochrana buněčných struktur rostliny proti poničení.

2.4.3.1. Aktivita galaktinolsyntáz

Již dlouhou dobu je aktivita (hladina exprese) GolS mnohými autory považována za klíčový regulační bod syntézy RFO (Saravitz et al., 1987; Keller a Pharr, 1996; Taji et al., 2002; Zuther et al., 2004; Blöchl et al., 2005; Peters et al., 2007), který reguluje množství vstupujícího uhlíku do této syntézy (Keller a Pharr, 1996). K tomuto závěru přispívá i skutečnost, že zatím nebyla nalezena jiná funkce galaktinolu v rostlině, nežli již zmíněný transport gal zbytků. U *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 7 genů GolS (Taji et al., 2002). Exprese a aktivita některých z nich jsou indukovatelné chladem, jiné suchem či zasolením (Taji et al., 2002), tepelným šokem (*A. thaliana*, listy- Panikulangara et al., 2004) či ABA (Taji et al., 2002; SE *Medicago sativa*- Blöchl et al., 2005). U jednoho z nich byly objeveny etylén-responzivní elementy a světlo-responzivní elementy (Panikulangara et al., 2004). Lze se proto domnívat, že regulace exprese GolS představuje místo střetu mnoha signalizačních drah reagujících na stav prostředí v němž se rostlina nachází.

2.4.3.2. Regulace syntézy RFO hladinami příslušných substrátů

Ne vždy byla pozorována těsná spojitost mezi aktivitou GolS a výslednou hladinou RFO. U semen dvou kultivarů hrachu s různým kvalitativním i kvantitativním zastoupením RFO nebyl prokazatelný rozdíl mezi mírami exprese golS ani aktivitami příslušných GolS. Navíc aktivity GolS byly 50 až 150krát vyšší, nežli hladina potřebná pro syntézu přítomných RFO (Peterbauer et al., 2001). Úzký vztah také nebyl prokázán mezi aktivitami GolS a přítomností rafinózy v semenech rajčete (Downie et al., 2003). Dokonce naměřené aktivity GolS jen mírně korelovaly s hladinami galaktinolu naměřenými u semen sedmi genotypů hrachu (Karner et al., 2004). Zde se autoři domnívají, že je výsledná hladina RFO spíše určována endogenními hladinami myo-inositolu. Tuto domněnku také podporuje zjištění, že snížení endogenní hladiny myo-inositolu u listů bramboru vedlo ke snížení hladin galaktinolu a RFO (Keller et al., 1998). Pokud byla navýšena endogenní hladina myo-inositolu jeho exogenním dodáním u semen hrachu, došlo ke zvýšení hladiny galaktinolu. To prokázalo, že v semenech byla přítomna dostatečně vysoká aktivita GolS pro syntézu galaktinolu z dodaného myo-inositolu (Karner et al., 2004). Tyto práce a další (Peters et al., 2007) naznačují, že spíše hladina myo-inositolu, nežli hladina enzymu, kontrolují syntézu galaktinolu. V případě semen

sedmi genotypů hrachu s rozdílnými endogenními hladinami myo-inositolu byl také nalezen relativně těsný vztah mezi hladinou sacharózy a výslednou hladinou RFO. Autoři se proto domnívají, že regulace syntézy RFO je zde spíše spjata s primárním metabolismem rostliny skrze hladiny myo-inositolu, sacharózy a UDP-galaktózy, nežli skrze aktivitu GolS (Karner et al., 2004). Lze si ale představit, že situace může být v různých rostlinách, orgánech nebo dokonce jejich vývojových stádiích různá.

2.4.3.3. Ovlivnění syntézy RFO syntézou ostatních galaktozylcyklitolů

U rostlin, které vedle RFO syntetizují v semenech jiné galaktozidy (semena *Pinus taeda* zřejmě syntetizují fagopyritol B1 (Pullman a Buchanan, 2008)), se zdá, že by v případě jejich paralelní syntézy se syntézou RFO mohlo jít o enzymatickou kompetici mezi nimi (Lahuta et al., 2005a). O tom, jaké cyklitoly se přednostně stanou akceptory α -galaktozylových zbytků, by tak mohla rozhodovat jejich molekulární struktura a endogenní hladina (Lahuta et al., 2005a,b). Právě GolS by mohla regulovat rozdělování galaktozylových zbytků mezi cesty syntézy RFO a fagopyritolů (tj. galaktozylcyklitolů odvozených od D-chiro-inositolu) například v semenech sóji (Lahuta et al., 2005a).

Forma galaktozidů v semeni často odpovídá aktuálnímu zastoupení cyklitolů ve vegetativní části rostliny (Kuo et al., 1997; Horbowicz et al., 1998; Hoch et al., 1999). U sóji jsou galaktopinitoly přirozenou součástí semen, neexistuje však žádný důkaz o syntéze pinitolu v semenech (Gomes et al., 2005). Jistě zajímavé je srovnat tuto situaci se situací u smrku ztepilého. Gösslová et al. (2001) se domnívají, že převážná část pinitolu během vývoje semen *Picea abies* byla lokalizována především v megagametofytu. V případě SE *Picea abies* přítomnost pinitolu detekována nebyla (Gösslová et al., 2001). Aplikace některých cyklitolů u semen rostlin, u kterých se běžně tyto formy nevyskytují, vedly k syntéze příslušných a pro danou rostlinu nepřirozených galaktozylcyklitolů (Lahuta et al., 2005a,b). Důležitou roli v řízení biosyntézy galaktozidů u semen, by tak mohla sehrávat mateřská rostlina vlivem regulace syntézy a transportu těchto látek do semen (Lahuta et al., 2005b).

2.5. Postmaturační ošetření SE konifer, kumulace RFO

Další vývoj zralých SE je do značné míry determinován úspěšností průběhu předešlých fází SEZ. Zralá SE se nejen morfologicky, ale také fyziologicky přibližují ZE. I přesto je konverze v rostlinu u takových SE často neúspěšná. Situaci lze zvrátit vlivem působení postmaturačních

ošetření, nejčastěji desikačním, případně chladovým, které SE fyziologicky ještě více přibližují zygotickému protějšku, například kumulací oligosacharidů rafinózové řady.

2.5.1. Tolerance k desikaci

Různá míra dehydratace (desikace) pletiv je přirozenou složkou konce vývoje ortodoxních semen. Může vést až k dosažení anhydrobiotického stavu, který umožňuje přečkání nepříznivých podmínek za značně snížené metabolické aktivity a je důležitým obdobím přechodu semen od režimu zrání k režimu klíčení (Kermode a Bewley, 1985).

Molekuly vody v buňce mají zásadní význam pro zachování stavby buněčných membrán a nativních konformací převážně většiny proteinů. V důsledku snižujícího se obsahu vody v buňkách a poklesu jejich objemu narůstá počet nežádoucích interakcí mezi molekulami a nebezpečně narůstá riziko možného poničení buněčných ultrastruktur (Senaratna a McKersie, 1983; Leprince et al., 1999; Hoekstra et al., 2001). Z tohoto důvodu dochází v ortodoxních semenech k indukci komplexu součinně působících ochranných faktorů (Reisdorph a Koster, 1999), což způsobuje značné změny na úrovni regulace genové exprese, změn metabolismu a někdy i anatomie samotných buněk (Xiong a Zhu, 2002). Indukce tolerance k desikaci je v semeni předprogramována a vývojově regulována a její počátek je pravděpodobně dán faktory pocházejícími z mateřské rostliny (Bewley a Black., 1994).

2.5.1.1. Indukce tolerance k desikaci u semen a SE jehličnanů

Ortodoxní semena nabývají plné tolerance k desikaci v období vrcholící kumulace zásobních látek. Pond et al. (2002) ukázali, že schopnost zrajících SE *Picea glauca* reagovat na indukční podmínky pro získání plné tolerance k desikaci (zde 5°C) vzrůstala s dosaženým vývojovým stádiem zrajících SE. Tolerance k desikaci je obecně u SE indukována aplikací ABA (během zrání SE konifer se jedná o běžnou složku média) v kombinaci s působením subletálního stresoru. Například podmínkou pro získání plné tolerance k rychlé desikaci u SE *Picea mariana* byl pozvolný pokles obsahu vody ve zralých SE během prvních 48h při relativní vzdušné vlhkosti (RH) = 97% (Bomal et al., 2002). U SE *Picea glauca* byla indukována tolerance k desikaci pěti až osmítýdenním zráním na médiu obsahujícím 16 μ M ABA a 7,5% PEG (M_r = 4000). Po dosažení nižšího obsahu vody než 55 % SE tolerovala rychlou desikaci (Attree et al., 1995). Také SE *Picea abies* zrající na médiu obsahujícím 16 μ M ABA a 7,5% PEG, tolerovala desikaci i při velmi nízké RH= 31%, nesměla však být předtím oddělena od zbytkové ESM

(Gorbatenko a Hakman, 2001). Desikace, která vedla ke snížení obsahu vody na hladinu 10 % během 48 hodin, byla tolerována SE *Picea mariana* po pětítýdenním zrání na médiu obsahujícím 6% sacharózu (Bomal a Tremblay 1999).

Chladové ošetření SE *Picea glauca* vedlo kromě již zmíněné plné tolerance k desikaci (Pond et al., 2002) také ke zvýšení tolerance SE k mrazu (von Aderkas et al., 2007). To napovídá, že mechanismy tolerance k desikaci a nízkým teplotám mohou být obdobné. To odpovídá také představě, že mechanismy tolerance nízkých teplot mohou být evolučně adaptované mechanismy tolerance k suchu.

Zralá SE podstupují desikaci vystavením podmínkám se sníženou konstantní relativní vzdušnou vlhkostí oproti situaci v nádobě, ve které zrála. Toho lze docílit například umístěním SE do uzavřené nádoby nad hladinu nasyceného roztoku anorganické soli ($RH(\text{Na}_2\text{HPO}_4)=97\%$; $RH(\text{Na}_2\text{CO}_3)=88\%$; $RH((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)=79\%$; $\text{NH}_4\text{NO}_3=63\%$) (např. Bomal a Tremblay, 1999). Mluví-li se o rychlé desikaci, je tím v rámci SEZ jehličnanů míněno vystavení otevřených kultivačních nádobek se SE proudění vzduchu v laminárním flowboxu po určitý čas (Bomal et al., 2002; Pond et al., 2002). Jistého stupně desikace lze dosáhnout pomalým desikačním ošetřením, kde jsou SE umístěna v uzařené nádobě nad navlhčeným filtračním papírem desilovanou vodou (Roberts et al., 1991b).

2.5.1.2 Mechanizmy tolerance desikace u semen

Předpokládané působení mechanismů ochrany buněčných struktur se liší v závislosti na míře dehydratace pletiv semen nebo SE. Při poklesu hladiny pod cca 23 % obsahu vody v cytoplazmě (jev je závislý na teplotě prostředí) se charakter působení ochranných složek výrazně mění, nemluví se již o toleranci k suchu, ale o toleranci k desikaci (Hoekstra et al., 2001). Desikace je u rostlin tolerována ortodoxními semeny, do jisté míry také semeny rekalcitrantními, ale u těchto semen závisí na samotném průběhu nastolení desikovaného stavu, pylovými zrny a výjimečně celými krytosemennými rostlinami, tzv. poikilohydrickými (např. Peters et al., 2007).

V ortodoxních semenech po indukci tolerance k desikaci dochází ke kumulaci některých oligosacharidů- sacharózy, RFO, galaktozylcyklitolů, nebo fruktanů a v menší míře také cyklitolů (Obendorf, 1997). Tyto látky jsou spolu s např. prolinem, glutamátem, glycinbetainem a cukernými alkoholy řazeny mezi tzv. kompatibilní soluty, tj. látky, které mohou být v buňkách přítomny ve vysokých koncentracích, aniž by negativně ovlivňovaly buněčné procesy. Při toleranci k suchu zamezují ztrátám vody z buňky snížením vodního potenciálu, a

tím navozují tzv. osmotické přizpůsobení buňky. Kompatibilní soluty při toleranci k suchu ale udržují především vodné obaly proteinů a membrán, čímž zachovávají nativní konformaci proteinů a také fluiditu a strukturu membrán takzvaným preferenčním vyloučením (více viz. Hoekstra et al., 2001).

Předpokládané mechanismy tolerance k desikaci jsou odlišné. V pletivech je již velmi malé množství volných molekul vody, hydratační obaly makromolekul mizí. Tolerance se účastní především sacharidy ve spojení s LEA proteiny, dále heat shock proteiny (HSP), antioxidantní systémy a zřejmě i amfifilní látky (Hoekstra et al., 2001). Redukující sacharidy, např. maltosa a monosacharidy bývají v desikovaných semenech přítomny jen v nízkých hladinách (Horbowicz a Obendorf, 1994).

Sacharidy

Předpokládá se, že se sacharidy podílejí na ochraně buněčných struktur během desikace několika způsoby na několika úrovních:

■ *OH-OH interakce* Kumulované sacharidy patrně mohou svými OH skupinami nahrazovat hydratační obaly makromolekul a membrán a zastoupit tak jejich funkci, jak ukazují mnohé studie s modelovými systémy *in vitro* (sacharidy s izolovanými lipidy, organelami, popřípadě lysozomy) (Caffrey et al., 1988; Koster et al., 1994; 2000; Xiao a Koster, 2001; Wolkers et al., 2004). Tuto funkci u rostlin zastává především sacharosa.

■ *Interakce sacharosa-RFO* Hladina sacharózy v buňkách semene vlivem syntézy a snižující se hladiny vody může přesáhnou míru, při které by mohlo docházet ke krystalizaci sacharózy uvnitř buňky (Williams a Leopold, 1989), což by vedlo ke ztrátě její ochranné funkce. RFO, které mohou vyvolávat poruchy krystalizační mřížky sacharosy, by mohly této krystalizaci zabránit (Caffrey et al., 1988). I z tohoto důvodu je často uváděno, že poměr RFO:sacharóza (R/S) je pro ochranu při desikaci více kritický, než absolutní hladiny sacharidů (Sauter a van Cleeve, 1991; Xiao a Koster, 2001).

■ *stav vitrifikace* Pokud hladina vody poklesne v pletivu pod 10 % z hmotnosti sušiny (Koster, 1991; Koster et al., 2000) nebo 30 % čerstvé hmotnosti, může být v buňkách ortodoxního semene dosaženo velice komplikovaného stavu tzv. vitrifikace (glassy state), pro který je typická vysoká viskozita cytoplazmy (Buitink et al., 2008). Navozený stav výrazně omezuje pohyb organel a molekul a způsobuje pokles metabolické aktivity (Williams a Leopold, 1989; McKersie, 1996). I zde se zřejmě uplatňuje funkční komplex sacharózy a RFO. Přítomnost RFO vedle navyšování viskozity cytoplazmy zvyšuje teplotu přechodu cytoplazmy ze stavu vitrifikovaného do nežádoucího stavu fluidního (Bernal-Lugo a Leopold, 1995; Sun, 1997).

Optimální poměr R/S udávaný pro udržení tohoto stavu je 1:5,7 (Koster, 1991; Koster & Bryant, 2005) ovšem i daleko nižší poměr- 1:20 byl označen za dostačující (Lin & Huang, 1994).

■ *míra metabolické aktivity* Leprince et al. (1995, 1999, 2000) ukazují, že míra metabolické aktivity patří mezi komponenty tolerance desikace. Domnívají se, že metabolismus musí být značně utlumen před dosažením plné tolerance k desikaci. Walters et al. (2001) ukázali, že snížení obsahu vody vedlo k razantnějšímu poklesu metabolické aktivity u semen k desikaci tolerantních oproti netolerantním. Mezi další předpoklad působení RFO během desikace patří snížení dostupnosti monosacharidů vlivem syntézy RFO vedoucí k utlumení respirace, a tím i metabolické aktivity semene (Leprince et al., 1992; Pammenter a Berjak., 1999).

■ *ochrana před reaktivními formami kyslíku* Důležitou součástí ochrany rostlinných pletiv během dehydratace jsou antioxidantní systémy likvidující reaktivní kyslíkové radikály (více např. Bailly et al., 2001; Francini et al., 2006; Pukacka a Ratajczak, 2007), které mohou vznikat vlivem dehydratace nesprávným tokem elektronů v mitochondriích a následně peroxidovat fosfolipidy (Leprince et al., 1994), oxidačně poškozovat proteiny a nukleové kyseliny. Nelze opomenout, že reaktivní formy kyslíku v určitých hladinách mají v ontogenezi rostlin vedle zmíněné škodlivé funkce také důležitou signální funkci (Bailly et al., 2008). Vedle tradičních antioxidantních systémů, mohou být reaktivní kyslíkové radikály zhašeny také polyoly (Obendorf, 1997).

LEA proteiny

Ke konci zrání a během desikace semena kumulují tzv. LEA (Late Emyogenesis Abundant) proteiny (Leal a Misra, 1993; Hoekstra et al., 2001; Wise a Tunnacliffe, 2004; Gilles et al., 2007). Funkce této rozmanité skupiny hydrofilních proteinů, dělené do vícero skupin na základě aminokyselinových motivů (Bies-Ethève et al., 2008), není zatím plně objasněna. K expresi LEA genů dochází i při působení abiotických stresorů ve vegetativních částech rostlin (Wise a Tunnacliffe, 2004). Mnohé práce naznačují, že se alespoň některé z nich podílejí na ochraně buněčných struktur při suchu i desikaci (Goyal et al., 2005; Grelet et al., 2005). Uvažuje se především o skupině extrémně hydrofilních dehydrinů (Close, 1996), které se pravděpodobně spolu s výše zmíněnými sacharidy podílejí na vytvoření a udržení vitrifikovaného stavu cytoplasmy (Hoekstra et al., 2001; Berjak., 2006). Dnes se předpokládá, že vitrifikovaný stav cytoplasmy je dán spolupůsobením vícero makromolekul (Buitink et al., 2000). V částech buňky, kam se dehydriny nevejdou se předpokládá udržování vitrifikovaného stavu pomocí sacharidů (Berjak, 2006).

Jinou skupinou látek ovlivňující strukturu a funkci membrán jsou amfifilní látky, které mají vlivem změn charakteru prostředí v cytoplasmě během dehydratace tendenci včleňovat se do membrán. To může vést ke zvýšení fluidity membrán (Golovina a Hoekstra, 2002) a dále také k nežádoucímu zvýšení jejich propustnosti (Golovina et al., 1998). Bylo prokázáno, že tento jev souvisí se získáním tolerance k desikaci u embryí pšenice (Golovina a Hoekstra, 2003). Předpokládá se, že toto narušení membrán umožňuje zlepšený přístup či přímo začleňování antioxidantů do membrán, a tím i jejich ochranu.

O tom, že ochranné mechanismy nejsou dokonalé svědčí mnohá pozorování, že při uskladnění zralých ortodoxních semen dochází k postupné ztátě klíčivosti a životaschopnosti semen v závislosti na skladovacích podmínkách (teplota, RH). U ortodoxních semen mnoha rostlin byl nalezen relativně úzký vztah mezi hladinou RFO (Bernal-Lugo a Leopold, 1992; 1995; Horbowicz a Obendorf, 1994) případně poměrem R/S (Lin a Huang, 1994; Lehner et al., 2006) a časem, po který si semena uchovávají vysokou klíčivost. Proto jsou tyto hodnoty zmíněnými autory považovány za markery skladovatelnosti semen. Opět ale existují práce, kde tato závislost pozorována není (např. Buitink et al., 2000). Dlohodobá vysoká klíčivost semen je spojována především s navozením a udržením vitrifikovaného stavu v buňkách spojeným se snížením pohybů molekul (Sun, 1997; Buitink et al., 1998, 2000). V případě semen *Impatiens walleriana* a *Capsicum annuum* nebyl prokázán podíl RFO na těchto mechanismech (Buitink et al., 2000).

Od modelových systémů ke stavu poznání dějů probíhajících v semeni

Na rozdíl od přesně definovaných modelových situací, je zatím stále téměř nemožné přímo prokázat v intaktních rostlinách, zda je nějaká předpokládaná složka tolerance aktivní součástí mechanismu jakékoli tolerance ke stresu. Jestli se nějaký sacharid účastní stresové odpovědi, či nikoli je stále nejčastěji usuzováno na základě současného nárůstu či poklesu hladiny sacharidů v rostlině spolu s nárůstem resp. poklesem míry její tolerance (Obendorf, 1997; Downie a Bewley, 2000; Peterbauer a Richter., 2001). Existuje několik prací, které spojují těsněji hladinu RFO s mírou tolerance, nikoli však přímo a navíc pouze ve vzrostlých rostlinách. Vnesení genu *GolS*, které posílilo syntézu galaktinolu a do jisté míry i rafinózy, vedlo u *Arabidopsis thaliana* k posílení tolerance k desikaci (Taji et al., 2002). Naopak snížení exprese enzymů degradujících RFO u *Petunia x hybrida* cv. Mitchell vedlo k nárůstu hladiny RFO a současně k nárůstu tolerance k mrazu. Nadexprese genu *GolS* z okurky u *A. thaliana* vedlo ke zvýšení hladin galaktinolu a následně rafinózy v listech, což přispělo ke zvýšení tolerance listů k desikaci, ale nikoli tolerance k mrazu (Zuther et al., 2004).

Existují ovšem i práce, které spojitost mezi RFO a tolerancí např. k desikaci u semen vyvracejí. Black et al. (1999) pozorovali nabytí tolerance k desikaci u embryí pšenice, které RFO běžně kumulují, a to i bez přítomnosti RFO po ztrátě velmi malého množství vody. Podobně také u semen *A. thaliana* nabytí a ztráta tolerance k desikaci časově nekorespondovaly s navýšením hladiny resp. degradace RFO (Ooms et al., 1993, 1994). Přesto se ale dnes do obecného povědomí dostává, že RFO jsou důležitou složkou tolerance především k desikaci, a to především u ortodoxních semen (např. Obroucheva et al., 2006).

2.5.1.3. Biochemické změny vyvolané postmaturačními ošetřeními u SE konifer

Dehydriny

Přítomnost dehydrinu 24 kDa byla také prokázána u zralých SE *Picea mariana*. Následných 48 hodin pomalé desikace (RH=97%), nikoli však 24 hodin, vedlo ke zdvojnásobení hladiny tohoto proteinu a indukci exprese dehydrinu 42 kDa (Bomal et al., 2002). Proteiny (23 a 29 kDa), které byly identifikovány pomocí protilátek proti dehydrinům hrachu, byly indukovány vystavením prostředí o RH vyšší 95% po dobu 4 dnů u SE *Pseudotsuga menziesii* (Carpenter et al., 2000).

Kumulace RFO během postmaturačních ošetření

U SE *Picea mariana* byla po výše zmíněném ošetření pozorována značná degradace uloženého škrobu za současného trojnásobného nárůstu hladiny sacharózy a výskytu rafinózy (R/S~0,07) s nabytím tolerance k rychlé desikaci (Bomal et al., 2002). Autoři se proto domnívají, že zmíněné změny metabolismu sacharidů a přítomnost dehydrinů navozené pomalou dehydratací SE by mohly být součástí mechanismů tolerance rychlé desikace u SE *Picea mariana*. Bomal a Tremblay (1999) se domnívají, že právě mírný pokles obsahu vody (5-15 %) během prvních dnů desikačního ošetření vede k žádané synchronizaci vývoje kořenového pólu SE *Picea mariana*.

Po třítydenním desikačním ošetření při vysoké RH byly u SE *Picea abies* naměřeny hodnoty R/S rovny 0,88 (Konrádová et al., 2003). Autoři také indukovali kumulaci RFO (R/S=0,44) u SE *Picea abies* chladem. Ošetření nevedlo ke ztrátě vody u SE jako v případě desikace, ale částečně nahradilo desikační ošetření v jeho pozitivním působení na klíčení embryí. Zda právě přítomnost RFO je zodpovědná u konifer za zlepšení klíčení embryí, zůstává nadále sporné i přes práci Carpenter a kol (2000). Zde autoři tvrdí, že klíčení SE konifer s vyšší hladinou RFO bude úspěšné. Autoři však používají hladinu RFO ve významu spíše jako

biochemický marker hodnotící dosavadní vývoj embryí a předpovídající jejich budoucí vývoj, nespojují však samotné RFO přímo se zlepšeným klíčením. Tuto úlohu přisuzují spíše dehydrinům. Zajímavé je, že zralá SE *Pseudotsuga menziesii* a *Pinus taeda* kumulovala rafinosu i stachyosu v nízkých hladinách (R/S~1:30) i bez postmaturačního ošetření. K dalšímu nárůstu RFO (o třetinu) došlo, pokud SE *Pseudotsuga menziesii* zrála na médiu obsahujícím 2,5% maltosu spolu s 1% glukosou oproti médiu kontrolnímu, obsahujícímu pouze 2,5% maltosu. Toto ošetření podle autorů přispělo ke zlepšení průběhu klíčení, ač došlo ke zvýšení výskytu abnormalit kořene. U zralých postmaturačně neošetřených SE *Picea abies* doposud RFO detekováno nebylo (např. Konrádová et al., 2003; Kubeš, 2004; Drážná, 2006).

ABA

Během desikace se mění endogenní hladiny ABA a případně i sensitivita embryí k ABA. V průběhu ZEZ *Picea abies* hladina ABA v semeni postupně narůstá a svého maxima dosahuje v pozdních fázích zrání (Kong et al., 1997). V případě semen *Pinus taeda*, bylo maximum naměřené hladiny ABA ve fázi globulárního stádia (Silveira et al., 2004b). Během snižování obsahu vody v semeni, hladina ABA opět klesá (Stasolla et al., 2002). Citlivost embryí vůči ABA může být navíc v této době snížena (Kong et al., 1997). Find (1997) se domnívá, že jím naměřený pokles endogenní hladiny ABA vlivem desikačního ošetření u SE *Picea abies* zapříčinil zvýšení frekvence klíčení. Podobně si vysvětluje Pond (2002) pozitivní vliv postmaturačně aplikovaného chladu (5°C) na následné klíčení SE *Picea glauca*. Silveira et al. (2004b) se domnívají, že vlivem silné dehydratace je pokles hladin fytohormonů (alespoň jejich aktivních forem) v ortodoxních semenech běžným jevem.

2.5.1.4. Kumulace RFO v semenech konifer

Také semena konifer kumulují RFO. V případě ZE *Picea abies* kumulace rafinózy začala 4 týdny po dosažení kotyledonárního vývojového stádia (konec července). Hladina rafinózy dále vzrůstala a následně byla kumulována i stachyóza. Po dalších šestnácti týdnech tvořilo RFO s převahou stachyózy více než polovinu všech rozpustných sacharidů a R/S dosáhl hodnoty 1,24 (Gösslová et al., 2001). Zbývající část semene *P. abies* byla co do rozpustných sacharidů kvalitativně podobná ZE, pouze celková hladina sacharidů byla nižší (Gösslová et al., 2001). U *Pseudotsuga menziesii* byla dynamika RFO v průběhu zrání ZE obdobná (Carpenter et al., 2000). Také u ZE pocházejících ze zralých semen *Picea glauca*, zastupovaly RFO značnou část z celkové hladiny rozpustných endogenních sacharidů. Zde na rozdíl od situace u *Picea*

abies byla detekována i verbaskóza (Downie a Bewley, 2000), která obvykle není běžně přítomna v semenech konifer (Carpenter et al., 2000). V případě semen *Pinus taeda* se s postupem dozrávání semen zvyšovala hladina především melibiózy, rafinózy a stachyózy a v nízkých hladinách i melezitózy. Zde docházelo v průběhu zrání k přechodné kumulaci D-chiroinositolu a pravděpodobně byla detekována i přechodná kumulace jeho příslušného galaktozidu- fagopyritolu B1 (Pullman a Buchanan, 2008).

Doposud se nepodařilo vyprodukovat SE konifer, u nichž byly hladiny RFO měřeny, které by kumulovaly R/S do výše hladin naměřených u ZE, které jsou často velmi vysoké (viz. výše). Často mnohokrát převyšují R/S určený za dostatečný pro ochrannou funkci RFO. Celková hladina sacharidů vztažená na jednotku suché hmotnosti byla však u ZE podstatně nižší oproti SE (Konrádová et al., 2003). Tento rozdíl však může být u ZE kompenzován zásobní funkcí megagametofytu.

Přestože pozitivní působení desikačního ošetření na klíčení SE konifer (lepší vývoj kořenového pólu, synchronizace vývoje) bylo mnohokrát popsáno (Roberts et al., 1991b; Kong a Yeung, 1992; Attree a Fowke, 1993; Attree et al., 1995; Lelu et al., 1995), žádný z autorů se příčinou tohoto jevu důkladněji nezabýval.

2.6. Klíčení

Ortodoxní semeno, které překonalo dormanci (Kermode 2005) a nachází se v prostředí s dostatečně vysokým vodním potenciálem pro svoji imbibici, přijímá vodu a posléze navyšuje svoji metabolickou aktivitu. Charakter embrya se mění ze sinku zásobního na sink metabolický. Vlivem absence struktur, které ZE v semeni konifer obklopují, dochází u SE nejen k odlišnému zásobování živinami (*Pinus radiata*- Lin & Leung, 2002b), ale liší se již samotný průběh imbibice embryí (Terskikh et al., 2005; Reid et al., 1999). I úspěšná rehydratace pletiv je pokládána za složku tolerance k desikaci.

2.6.1. Imbibice

Anatomické uspořádání semene způsobuje pomalou a postupnou rehydrataci ZE. Voda je v semeni směrována tak, že nejprve dochází k hydrataci děloh, následně hypokotylu a nejpozději kořenového pólu embrya – to vše za 70-90h (*Pinus monticola*- Terskikh et al., 2005) či 65h (*Picea glauca*- Attree et al., 1992). Oproti tomu u SE *Picea glauca* docházelo k rehydrataci již za pouhé 2h (Attree et al., 1992).

Samotný průběh rehydratace SE i ZE má značný vliv na životaschopnost klíčnicích rostlin. Způsob rehydratace může ovlivnit propustnost buněčných membrán (Reid et al., 1999). S narůstajícím únikem intracelulárních látek klesá germinační potenciál semen (Thornton et al., 1990). Semena *P. glauca* během imbibice uvolnila do prostředí méně než 20% celkového obsahu K^+ oproti 74-91 % u SE nebo extirpovaných ZE (Reid et al., 1999). Teorií pro vysvětlení této propustnosti membrán existuje vícero (více viz. Reid et al., 1999).

2.6.2. Nárůst metabolické aktivity

Po imbibici prudce narůstá příjem kyslíku a vzrůstá oxidativní fosforylace pro pokrytí energeticky vysoce náročného klíčení (*Pinus pinea*- Tommasi et al., 2001). To spolu s mobilizací zásobních látek vede k produkci ROS. Prodanović et al. (2007) prokázali vyšší životaschopnost semen *Picea omorika* se zvýšenou aktivitou antioxidantních enzymů. Tommasi et al. (2001) pozorovali značné změny redoxních poměrů během klíčení u semen *Pinus pinea*.

Úlohou megagametofytu v průběhu klíčení semen *Pinus radiata* se zabývali Lin & Leung (2002 a,b). Prokázali, stejně jako Carrier et al. (1997) u *Picea glauca*, že zralá extirpovaná ZE nejsou schopna vývoje bez dodání exogenního sacharidu do média. Nejčastěji je v SEZ konifer aplikována sacharóza v koncentraci 1-3%. To je v souladu s obecně přijímaným faktem, že produktem glukoneogeneze probíhající v megagametofytu během klíčení je sacharóza, která je embryem následně využívána (např. Downie a Bewley, 2000). Vedle lipidů jsou při klíčení SE i ZE také degradovány zásobní proteiny (Hakman et al, 1990; Attree & Fowke, 1993; Misra et al., 1993; Misra, 1994; Stone & Gifford 1997, Kormuťák et al., 2006).

Bewley & Black (1994) a Blöchl et al., (2007) se ovšem domnívají, že mobilizace polymerních zásobních látek je příliš pomalá na pokrytí nároků klíčících semen v nejranějších fázích klíčení. Právě v této době dochází obecně k velice rychlé degradaci RFO jak v semenech (Downie & Bewley, 2000; Peterbauer & Richter, 2001), tak SE (Kubeš, 2004). O rychlém metabolismu odštěpené galaktózy svědčí fakt, že její hladina během této doby nikterak markantně nenarůstá (Downie a Bewley, 2000). Blöchl et al (2007) blokovali u semen *Pisum sativum* aktivitu α -galaktozidáz pomocí inhibitoru 1-deoxygalaktonojirimycinu (DGJ). To mělo za následek zpomalení klíčení semen a rovněž snížení aktivity enzymů podílejících se na metabolismu galaktózy. Aplikace galaktózy revertovala na rozdíl od sacharózy plně účinky inhibitoru. Autoři se proto domnívají, že RFO, respektive galaktóza, je důležitým a pohotovým

zdrojem energie pro rané fáze klíčení semen hrachu. Rovněž naznačují signální úlohu galaktózy v průběhu klíčení.

2.6.3. RFO jako osmotikum a zdroj osmotika

RFO by mohly také představovat významný zdroj osmoticky aktivních látek-monosacharidů, které jsou odštěpovány během prudké degradace RFO v raných fázích klíčení. V této době dochází k prodlužovacímu růstu buněk osy embrya, který je vyvolán snížením osmotického potenciálu buněk a nárůstem vtoku vody do nich. Downie a Bewley (2000) pozorovali 10krát více hexóz v ose klíčících ZE *Picea glauca* nežli v jejich dělohách. V případě semen *Aesculus hippocastanum*, která ale nejsou ortodoxní, přispělo RFO svou degradací ke snížení vodního potenciálu jen minimálně (Obroucheva et al., 2006). Ovšem situace u klíčících semen jehličnanů může být odlišná, protože zde jsou hladiny RFO a poměr RFO: sacharosa daleko vyšší.

3. Materiál a metody

Udržování embryogenní kultury a všechny pokusy probíhaly na Katedře fyziologie rostlin Univerzity Karlovy v Praze (KFR PŘF UK).

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

3.1.1. Rostlinný materiál

Ve všech pokusech byla použita embryogenní linie smrku ztepilého AFO 541, která byla odvozena ve francouzském institutu AFOCEL z děloh pětidenních semenáčků smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) (Galerie et al., 1992; Ruaud et al., 1992).

3.1.2. Kultivace

Pro sterilní kultivaci v podmínkách *in vitro* byly použity kultivační nádoby typu Magenta (Sigma). Kultivace, pokud není uvedeno jinak, probíhala za tmy se subkultivačním intervalem 1 týden v kultivačním boxu při teplotě 25°C.

3.1.2.1. Udržování kultury

Embryogenní kultura byla udržována a množena na pozměněném médiu Gupta a Durzan (1986) obsahujícím 3% sacharózu (w/v) (Lachema, ČR) a zpevněném 3% agarem (w/v) (Sigma). Minerální živiny (složka A) byly dodávány ze tří samostatných zásobních lahví skladovaných v lednici při 4-6°C. pH média bylo upravováno na hodnotu $5,7 \pm 0,01$. Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 20 minut při 121°C a tlaku 0,144 MPa. Organické doplňky (složka B, Sigma a Lachema) a růstové regulátory (složka C, Sigma) byly asepticky dodávány do částečně zchlazeného média. Tyto roztoky (složky B a C) byly před použitím uchovávány ve sterilním stavu v zásobních lahvích při -18°C (pH složek C a D upraveno ihned po přípravě na 5,7; aseptická sterilizace přes filtry Millipore 0,45µm). Médium bylo rozléváno po cca 25 ml do sterilních kultivačních nádob.

Tabulka I. Složky modifikovaných kultivačních médií GD (Gupta & Durzan, 1986)

Složka	Komponenty složky	Koncentrace v zásobním roztoku (mg.l ⁻¹)	Finální koncentrace v médiu (mg.l ⁻¹)
A – makroprvky (50 ml na 1l média)	NH ₄ NO ₃	5 500	275
	KNO ₃	46 800	2 340
	CaCl ₂	3 320	166
	MgSO ₄ .7H ₂ O	3 700	185
	KH ₂ PO ₄	1 700	85
A – mikroprvky (10 ml na 1l média)	H ₃ BO ₃	310	3,1
	MnSO ₄ .H ₂ O	845	8,45
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	491,5	4,915
	KI	41,5	0,415
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,5	0,125
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25	0,0125
	CoCl ₂	0,68	0,0068
A – železo (10 ml na 1l média)	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 400	14
	Na ₂ EDTA	1 900	19
B – organické doplňky (25 ml na 1l média)	glycin	40	1
	L-glutamin	18 000	450
	kasein-hydrolyzát	20 000	500
	myo-inositol	40 000	1 000
	kyselina nikotinová	10	0,25
	pyridoxin.HCl	10	0,25
	thiamin.HCl	20	0,5
C – růstové regulátory (25 ml na 1l média): jen pro proliferační médium	2,4-D	44	1,1
	kinetin	17,2	0,43
	bAP	17,2	0,43
ABA (20 ml na 1l média): jen pro maturační médium	ABA	264	5,28

3.1.2.2. Zrání kultury

Pro navození procesu zrání byla kultura přenesena na maturační médium, které se od média udržovacího lišilo přítomností 20 μ M kyseliny abscisové (ABA) (\pm -cis,trans- ABA, Sigma) a absencí růstových regulátorů specifických pro fázi udržovací (tj. složka C). Zásobní roztok ABA (pevná ABA rozpouštěna v 1M NaOH, pH upraveno na $6 \pm 0,05$) byl sterilizován filtrací přes filtry Millipore (0,45 μ m) do zásobní lahve a skladován v mrazničce při -18°C. Dodáván byl do částečně zchlazeného média po rozmrznutí, které probíhalo vždy při pokojové teplotě.

Embrya zrála na maturačním médiu s týdenním subkultivačním intervalem po dobu šesti týdnů. Tekutá maturační média byla složením shodná s médii pevnými, pouze nebyl do média přidán agar. Kultivace na tekutých médiích probíhala ve vyšších krabičkách Magentového typu (Sigma) s 35-40 ml média/nádoba na prámciích s plováky (Osmotec, Izrael).

Extirpce zralých SE a jejich následná kultivace na různých tekutých maturačních médiích

V některých případech byla zralá SE po šesti týdnech zrání sterilně extirpována. Vždy jednotlivá SE ze dvou kultivačních nádob byla postupně přenášena do jiné (přechodné) nádoby obsahující tekuté médium (v tomto případě bez prámku a plováku) se složením shodným s maturačním médiem, ale bez ABA. Ihned po extirpci SE ze dvou kultivačních nádob byla SE z přechodné nádoby buďto: a) rovnou přecezena přes prámek v jiné kultivační nádobě a následně přenesena i s prátkem do konečné kultivační nádoby s tekutým maturačním médiem nebo b) ponechána v přechodné nádobě ještě po dobu 15-ti minut třepat na třepače (120 otáček/min), čímž mělo dojít k omytí extracelulárních enzymů z povrchu SE. Takto ošetřená SE byla kultivována na tekutých médiích po dobu čtyř nebo sedmi dnů v závislosti na složení média.

Modifikace složení maturačních médií

- 3% sacharóza vynechána a nahrazena ekvimolárním množstvím sacharózy (1,5%, w/v) a rafinózy.5H₂O (2,6%, w/v) (Sigma)
- 3% sacharóza vynechána a nahrazena 1% galaktózou (w/v) (Sigma)
- 3% sacharóza vynechána a nenahrazena- médium neobsahující sacharid
- 3% sacharóza nevynechána a koncentrace myo-inositolu navýšena na 0,2% (w/v), 0,6% (w/v) a 1% (w/v) (Sigma)

Sterilní roztok rafinózy.5H₂O (sterilizace filtrací přes filtry Millipore (0,45 μm)) byl přidáván do vyklávaného maturačního média s obsahem agaru po jeho částečném zchladnutí, v případě tekutého maturačního média po jeho vychladnutí.

3.1.2.3. Postmaturační ošetření

Zralá SE, která nejevila žádné abnormality nebo poruchy struktury a která vytvořila minimálně čtyři dělohy, byla vystavena působení jednoho či kombinacím několika postmaturačních ošetření.

- Chladové ošetření probíhalo v lednici vytemperované na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ v kultivačních nádobkách na médiích, na kterých SE zrála poslední týden zrání. Ošetření bylo aplikováno 3-6 týdnů. Během chladového ošetření nebyla SE přenášena na čerstvé maturační médium.
- Standardního ošetření pomalou desikací bylo dosaženo přenesením cca padesáti extirpovaných SE na suchý filtrační papír umístěný v otevřené Petriho misce o \varnothing 3-4 cm. Postupně byly čtyři takové misky (resp. poloviny misek) přenášeny do uzavřené velké Petriho misky o \varnothing 12 cm na tři vrstvy suchého sterilního filtračního papíru, který byl následně navlhčen sterilní destilovanou vodou (10-15 ml). Poté byla velká Petriho miska uzavřena a utěsněna dvěma vrstvami parafilmu. Sterility bylo dosaženo aseptickým přenosem embryí do předem zklávaného zde popsaného systému. SE byla desikována na světle při 20°C , pokud není uvedeno jinak.
- Desikační ošetření za 97% relativní vzdušné vlhkosti probíhalo asepticky na světle při 20°C ve velkých kultivačních nádobách Magentového typu, ve kterých byl nad hladinou nasyceného roztoku Na_2HPO_4 umístěn právek s extirpovanými embryi. Tím bylo v plynné fázi desikační nádoby dosaženo 97% relativní vzdušné vlhkosti. V jedné desikační nádobě byla vždy desikována embrya pocházející ze dvou kultivačních nádob, ve kterých zrála.
- Současná kombinace desikačního a chladového ošetření byla svým uspořádáním shodná s pomalým standardním desikačním ošetřením nebo desikačním ošetřením za 97% relativní vzdušné vlhkosti, pouze teplota byla snížena na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (viz. chladové ošetření). Tato desikace probíhala za tmy.
- Tepelný šok byl navozen působením $38 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 60 minut. Následovala extirpce embryí a týdenní kultivace na tekutém maturačním médiu standardního složení.

3.1.2.4. Klíčení somatických embryí

25 SE bylo položeno na nakličovací médium v kultivační nádobě. Jednalo se o modifikované GD médium obohacené o 1% (w/v) sacharózu, 0,8% (w/v) agar a 0,4% (w/v) aktivní uhlí. Médium neobsahovalo růstové regulátory a pH média bylo upravováno na hodnotu $5,7 \pm 0,05$. Suspenze aktivního černého uhlí doplněná o 333 mg.l^{-1} MES byla

připravována odděleně v objemu odpovídajícím polovině celkového objemu média (pH upravováno 2-3x vždy po 20 minutách míchání na hodnotu 5,7-5,8). Po sterilizaci v autoklávu bylo částečně zchladlé médium přilito k suspenzi aktivního uhlí a následně byla přidána složka B viz tab. I. Médium bylo rozléváno do kultivačních nádob (Magenta, Sigma) téměř zchladlé, aby nedocházelo k usazování aktivního uhlí na jejich dně. Pro zachování homogenity média bylo důležité časté promíchávání média během jeho chladnutí před rozlitím i po jeho rozlití v kultivačních nádobách. Klíčení probíhalo bez subkultivace v kultivační místnosti po 3 týdny při $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ se světelným režimem 16h světlo/8h tma.

Inhibice α -galaktozidáz pomocí 1-deoxygalaktonojirimycinu

Po třítýdenním desikačním ošetření somatických embryí za chladu byly desikační Petriho misky o \varnothing 12 cm otevřeny a do každé z vnitřních Petriho misek o \varnothing 3-4 cm, obsahujících postmaturačně ošetřená somatická embrya, bylo přilito 3-4 ml 50 μM sterilního roztoku specifického inhibitoru 1-deoxygalaktonojirimycinu (Sigma) přefiltrovaného přes filtry Millipore (0,45 μm). Přesně po dvou hodinách byla embrya přenesena do kultivačních nádob s modifikovaným germinacním médiem, na jehož povrchu byl umístěn filtrační papír. Filtrační papír byl položen na médium minimálně 12h před vysazením embryí, aby došlo k vyrovnání koncentrací látek mezi médiem a filtračním papírem. Během tohoto pokusu byla somatická embrya přenášena naráz s filtračním papírem po třech dnech klíčení na čerstvé germinacní médium standardního složení.

Modifikace složení germinacních médií

- náhrada 1% sacharózy za 1% galaktózu
- médium neobsahující sacharid

3.2. Zygotická embryogeneze smrku ztepilého

3.2.1. Rostlinný materiál

Semena byla získána ze šišek několika čerstvě pokácených vzrostlých jedinců u obce Vlčí okres Plzeň-jih 4. 4. 2009.

3.2.2. Sterilizace semen

Semena byla částečně sterilizována 15% Savem po dobu 20 minut.

3.2.3. Klíčení

Po sedmihodinové imbibici semen v destilované vodě nebo 50 μ M roztoku specifického inhibitoru 1-deoxygalaktonojirimycinu byla semena přenesena do Petriho misek o \varnothing 12 cm v počtu 100 až 120 semen/miska na tři vrstvy filtračního papíru. Následně bylo připipetováno do každé misky 10ml jednoho z následujících roztoků: destilovaná voda, 50 mM galaktóza, 50 mM sacharóza, 50 μ M DGJ, 50 μ M DGJ + 50 mM galaktóza, 50 μ M DGJ + 50 mM sacharóza. Klíčení probíhalo při teplotě 25°C za světelného režimu 16h světlo/8h tma.

3.3. Somatická embryogeneze jedle (hybrid *Abies alba* x *A. numidica*)

3.3.1. Rostlinný materiál

Embryogenní linie hybridu *Abies alba* x *A. numidica* AN72 byla odvozena z nezralého zygotického embrya v Ústavu genetiky a biotechnologií rostlin Slovenské akademie věd počátkem 90. let 20. století.

3.3.2. Kultivace

Kultura byla udržována a zrála ve tmě ve sterilních plastových Petriho miskách při 25°C.

3.3.2.1. Udržování kultury

Embryogenní kultura byla udržována a množena na (pozměněném) DCR médiu obohaceném 2% (w/v) sacharózou, 0,1% (w/v) kasein-hydrolyzátem (Sigma), 0,05% (w/v) L-glutaminem (Sigma) a 0,01% (w/v) myo-inositolem (Sigma). Tyto složky byly vždy odděleně rozpouštěny v malém množství vody a přidávány do média jako poslední složky před jeho sterilizací. Z růstových regulátorů bylo do média dodáván 1 mg.l⁻¹ BAP (Sigma). Ostatní komponenty viz tab II. byly uskladněny ve formě zásobních roztoků při 4°C, zásobní roztok vitamínů zamražen při -18°C. pH média bylo upravováno na 5,7 \pm 0,05. Médium bylo následně rozléváno po 0,5 l do lahví s modrým uzávěrem. Za silného míchání bylo do každé

láhve přisypáno 1,5 g fytagelu (tj. 0,3% (w/v) fytigel, Sigma). Po přidání všech komponent média probíhala jeho sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při 121°C a tlaku 0,144 MPa. Částečně zchladlé médium bylo asepticky rozléváno do sterilních plastových Petriho misek o \varnothing 9 cm do cca 2/3 výše misky. Subkultivační interval pro udržování kultury byl tři týdny, pro množení kultury dva týdny.

Tabulka II. Složky modifikovaných kultivačních médií DCR

Složka	Komponenty složky	Koncentrace v zásobním roztoku (mg.l ⁻¹)	Finální koncentrace v médiu (mg.l ⁻¹)
Makroprvky (30 ml na 1l média)	NH ₄ NO ₃	13 333,3	400
	KNO ₃	11 333,3	340
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	18 533,3	556
	KH ₂ PO ₄	5 666,7	170
	CaCl ₂	2 140	64,2
Mikroprvky (5 ml na 1l média)	H ₃ BO ₃	1 240	6,2
	MnSO ₄ .H ₂ O	4 460	22,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 720	8,6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	50	0,25
	KI	166	0,83
Železo (5 ml na 1l média)	FeSO ₄ .7H ₂ O	5 560	27,8
	Na ₂ EDTA	7 460	37,3
Další mikroprvky (0,1 ml na 1l média)	NiCl ₂ .6H ₂ O	458,1	0,04581
	CoCl ₂ .6H ₂ O	250	0,025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2 500	0,250
MgSO₄.7H₂O (10 ml na 1l média)	MgSO ₄ .7H ₂ O	37 000	370
Vitamíny (5 ml na 1l média)	Thiamin.HCl	200	1
	Pyridoxin.HCl	100	0,5
	Kyselina nikotinová	100	0,5
	Glycin	400	2
BAP (10 ml na 1l udržovacího média)		100	1
ABA (součást pouze maturačního média)		-----	10

3.3.2.2. Zrání kultury

Pro navození procesu zrání byla rozprostřena co nejtenší souvislá vrstva embryogenní kultury na vrstvu předem zklávaného filtračního papíru položeného na maturační médium v plastové Petriho misce o \varnothing 9cm.

Maturační médium (pozměněné DCR médium) se lišilo od média udržovacího především přítomností kyseliny abscisové (\pm -cis,trans- ABA, Sigma) viz. tab. II a 10 % (w/v) polyetylen glykolu (PEG Mr= 4000, Duchefa) a absencí BAP. Krystalická ABA byla rozpouštěna v malém množství 1M KOH, zředěna cca 10 ml H₂O a přidána k ostatním složkám média ještě před klávaním. PEG 4000 byl rozpuštěn ve vodě za mírného zahřívání a míchání a rovněž přidán k ostatním složkám média před klávaním. Jisté odchylky od udržovacího média byly také v organických doplňcích: 0,05% (w/v) kasein-hydrolyzát (Sigma), 0,05% (w/v) L-glutamin (Sigma), 0,01% (w/v) myo-inositol, 3% (w/v) sacharóza, nebo 3,15776% (w/v) maltóza.H₂O.

Zrání probíhalo po dobu 9-10 týdnů za tmy při 25°C. Kultura byla po čtyřech týdnech zrání přenášena spolu s filtračním papírem na čerstvé maturační médium. Po osmi týdnech zrání byla přenesena na tzv. dozrávací médium, které bylo identické s maturačním médiem, neobsahovalo však ABA ani PEG 4000. Konec zrání byl dán rychlostí zelenání děloh embryí a snahou embryí klíčit na dozrávacím médiu. Bylo proto nutné kulturu sledovat a těsně před naklíčením proces ukončit.

3.3.2.3. Postmaturační ošetření

Zralá somatická embrya byla vystavena pomalému desikačnímu ošetření viz. kap. 3.1.2.3. po dobu dvou týdnů při 25°C za tmy.

3.3.2.4. Klíčení somatických embryí

Zralá, desikačně ošetřená embrya byla pokládána na nakličovací médium (pozměněné DCR médium) obsahující 2% (w/v) sacharózu, 1% (w/v) aktivní uhlí (Sigma) a 3% (w/v) fytigel (Sigma). Aktivní uhlí bylo přidáváno obdobně jako fytigel přímo do média po upravení pH před jeho zklávaním. Ostatní organické doplňky byly co do množství shodné s dozrávacím médiem.

První fáze klíčení probíhala v plastových Petriho miskách o \varnothing 9 cm za tmy při 25°C. Byla ukončena po prodloužení hypokotylu a prorůstání kořene. Následně byly klíčící rostliny

přeneseny do Petriho misek o \varnothing 9 cm s čerstvým médiem do kultivační místnosti s 16h světlo/8h tma, 25°C. Případná další kultivace probíhala v podmínkách identických jako za fáze druhé, pouze klíčící rostliny byly přeneseny na nakličovací médium v kultivačních nádobách typu Magenta.

3.4. Odběr materiálu

Vzorky byly odebírány do mikroskopavek vždy z několika náhodně zvolených kultivačních nádob. V případě somatické embryogeneze jedle byla v 0. a 4. týdnu zrání odebírána celá embryonálně suspenzorová hmota. Ve všech ostatních případech, kdy to již bylo možné, byla odebírána somatická embrya. Vždy bylo odebráno 150-200 mg embryí/vzorek, v případě desikovaných embryí pouze 50-100 mg.

Vzorky byly bezprostředně po odebrání zváženy pro zjištění čerstvé hmotnosti a ihned zmrazeny v kapalném dusíku. Do dalšího zpracování byly vzorky uloženy v mrazicím boxu při teplotě -80°C.

3.5. Extrakce sacharidů

Sacharidy byly extrahovány dle následujícího postupu:

- 1) lyofilizace pomocí zařízení Lyovac GT 2 (Finn-Aqua) 12 až 14 hodin, poté zvážení suché hmotnosti
- 2) inkubace s 0,5 ml 80% metanolu (v/v) při 75°C po dobu 15 minut
- 3) odpaření metanolu ve vakuu (Speedvac Plus SC110A, Savant) po dobu 3 hodiny
- 4) přidání demineralizované vody (MilliQ) dle suché hmotnosti vzorku viz tab. III

Tabulka III.

hmotnost sušiny (mg)	5-10	10-20	20-30	30-40
objem přidané milliQ H ₂ O (ml)	0,3	0,5	1	1,5

- 5) ultrazvuková lázeň (Julabo USR 05)- 15 minut
- 6) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf- 30 minut
- 7) odebrání supernatantu a jeho filtrace přes membránové fitry Millex Millipore (0,22 μ m) do čistých mikroskopavek
- 8) Zamrazení připravených vzorků při -18°C.

3.6. Stanovení obsahu a spektra sacharidů

Sacharidy byly stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Parametry měřicího systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-71); isokratická pumpa Spektra Physics; integrace: počítačový program CSW 1.7; teplota 80°C; předkolonky Hema-Bio 1000 SB+Q (Watrex); kolona polymer IEX 8 μm Pb²⁺ (Watrex); eluent: demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku 0,5 ml. min⁻¹; objem injikovaného vzorku: 10 μl ; standardy: Sigma.

3.7. Hodnocení klíčních rostlin

Z důvodu lišící se morfologie klíčních rostlin mezi jednotlivými variantami lišícími se postmaturačními ošetřeními, nebylo možné nastavení přesných kvantitativních parametrů hodnocení. Pro zajištění co nejvyšší objektivity hodnocení, byly klíčící rostliny v průběhu práce po uplynutí daného intervalu klíčení skenovány, a po ukončení všech pokusů byly hodnoceny naráz. Klíčící rostliny byly řazeny do čtyř základních tříd podle charakteru vývoje kořene, hypokotylu a apikálního meristému spolu s dělohami po třech týdnech klíčení. Hodnotilo se, zda došlo k vývoji a růstu dané struktury embrya a zda zde byl přítomen či nepřítomen kalus.

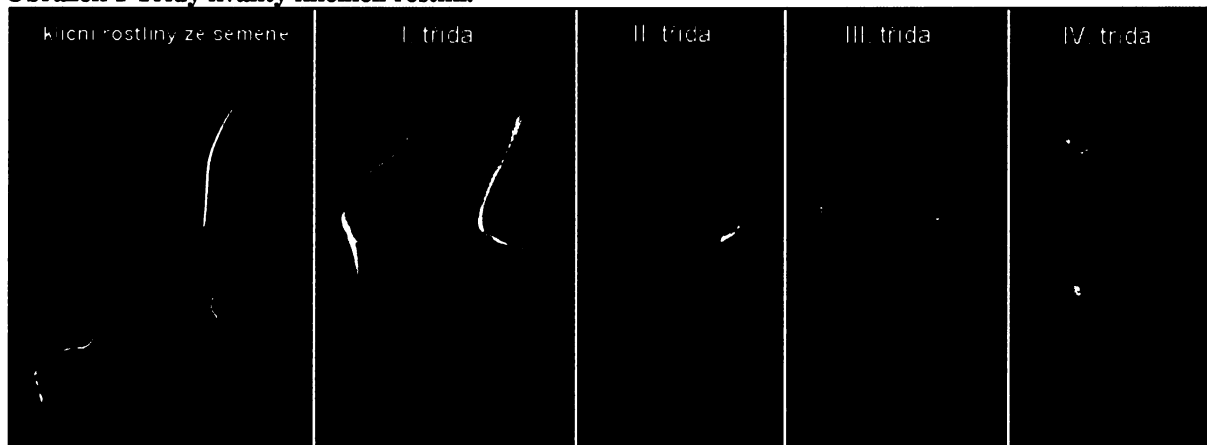
třída I.- kořen viditelně prorůstá a prodlužuje se, stává se oporou embrya při růstu; dochází k prodlužování hypokotylu; dělohy se spolu s apikálním meristémem vyvíjejí souměrně, jsou svěže zelené, na všech částech nejsou přítomny známky kalusu, klíčící rostlina se blíží strukturou rostlinám klíčícím ze semene.

třída II.- kořen viditelně prorůstá, ale vývoj je pomalejší než u třídy I (kořen se nestává oporou klíčící rostliny při růstu na médiu, časté hákovité zahnutí klíčící rostliny), kalus není přítomen nebo pouze v malém rozsahu u báze embrya; hypokotyl se prodlužuje, kalus je přítomný pouze v malém rozsahu (často na straně přivrácené k médiu), dělohy se vyvíjejí asymetricky, jsou zelené.

třída III.- kořenový pól se nevyvíjí, pokud se vyvíjí, je přítomen kalus nebo dochází k prasknutí kořene; hypokotyl se prodlužuje, ale nepraská, často je přítomný kalus; dělohy často olivově zelené, vývoj děloh výrazně asymetrický, pomalý, často je přítomný kalus.

třída IV.- kalus přítomen na všech strukturách embrya, pokud jsou tyto struktury vůbec přítomny; často nelze rozeznat původní póly embrya, případně nedochází k žádnému vývoji nebo embryo hyne. Do této třídy byly zahrnuty i klíčící rostliny, u kterých docházelo k viditelnému prorůstání kořene bez přítomného kalusu, zbytek embrya se ale zcela nevyvíjel viz. obrázek 1.

Obrázek 1 Třídy kvality klíčících rostlin.



3.8. Měření přírůstku klíčících somatických embryí po aplikaci inhibitoru DGJ

Po aplikaci DGJ viz. výše, následovalo třídenní klíčení SE. Během této doby, byla SE v laminárním flowboxu sterilně fotografována pomocí digitální zrcadlovky. Následná kultivace a zopakování fotografování embryí umožnily zjištění přírůstku jednotlivých SE během sledovaného časového intervalu. Filtrační papír, na kterém SE klíčila, nesloužil pouze jako pomůcka pro snadný a neinvazivní způsob subkultivace klíčících rostlin po třech dnech klíčení, ale i jako zábrana případného prorůstání klíčících rostlin do média. Délky SE byly změřeny v programu Adobe Photoshop 6.0.

3.9. Statistické zpracování dat

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

3.10. Přehled experimentů

Tato kapitola by měla poskytnout přehled o provedených experimentech, typu použitých médií a analýzách. U každého experimentu rovněž uvádím informaci o počtu provedení jednotlivých pokusů.

Somatická embryogeneze smrku ztepilého

Experiment 1:

- 0. až 5. týden zrání- standardní PMM
- 6. týden zrání- standardní PMM (3% sacharóza)
 - x
 - pozměněné PMM- náhrada 3% sacharózy za 1,5% sacharózu + 2,6% rafinózu.5H₂O (PMM S+R)
- Postmaturační ošetření (standardní ošetření pomalou desikací, nebo třítýdenní chladové ošetření)
- Klíčení
- Analýza obsahu endogenních rozustných sacharidů (odběry po 5. a 6. týdnu zrání; po postmaturačních ošetření)

- počet provedení 3 z toho 2 prezentována

Experiment 2:

- 0. až 5. týden zrání - standardní PMM
- 6. týden zrání- standardní TMM (0,1% myo-inositol)
 - x
 - pozměněné TMM v hladinách myo-inositolu (0,2%, 0,6%, 1%)
- Postmaturační ošetření (standardní ošetření pomalou desikací, nebo chladové ošetření)
- Klíčení, klasifikace třítýdenních klíčnicích rostlin
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry po 5. a 6. týdnu zrání; po postmaturačních ošetření)

- počet provedení 2

Experiment 3A:

- 0. až 6. týden zrání- standardní PMM
- Extirpce, oplach
- od počátku 7. týdne po čtyři dny- standardní TMM (3% sacharóza)

x

TMM S+R

- Postmaturační ošetření (chladové nebo desikační ošetření při 97% RH nebo aplikace obou ošetření současně)
- Klíčení, klasifikace třítýdenních klíčnicích rostlin
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry po 6. týdnu zrání; po čtyřdenní kultivaci na TMM; po postmaturačních ošetřeních)

Experiment 3B:

- 0. až 6. týden zrání- standardní PMM, po případné extirpci oplach
- Od počátku 7. týdne zrání na:

extirpce	testovaná média				doba kultivace		
ano	standardní TMM	*	* * *	x	TMM S+R	* * *	4 dny
ne	standardní TMM			x	TMM S+R		4 dny
ano	standardní TMM	* *		x	TMM Gal	* *	1 týden
ano	standardní TMM	* *		x	TMM 0		1 týden
ano	standardní TMM	* *					1 týden
ne	standardní PMM						1 týden

červeně- aplikace tepelného šoku před extirpcí

- Postmaturační ošetření (hvězdičky značí aplikované varianty postmaturačních ošetření: chladové ošetření (*); nebo standardní ošetření pomalou desikací (^); současná kombinace chladového ošetření a ošetření pomalou desikací (*); postupná kombinace chladového a ošetření pomalou deikací (^); ošetření pomalou desikací za tmy (*)).
- Klíčení, klasifikace vybraných třítýdenních klíčnicích rostlin
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry po 6. týdnu zrání; po ukončení kultivace na maturačních médiích v 7. týdnu zrání, po postmaturačních ošetřeních)

Experiment 3C:

- 0. až 6. týden zrání- standardní PMM, po případné extirpci oplach

- Od počátku 7. týdne zrání na:

ošetření	standardní TMM	* * *	x	TMM S+R	* *	doba kultivace
ano	standardní TMM	* * *	x	TMM S+R	* *	4 dny
ano	standardní TMM	**	x	TMM Gal	**	1 týden
ano	standardní TMM	**	x	TMM 0	**	1 týden
ano	standardní TMM	**				1 týden
ne	standardní PMM					1 týden

červeně- aplikace tepelného šoku před extirpcí

- Postmaturační ošetření (hvězdičky značí aplikované varianty postmaturačních ošetření: chladové ošetření (*); standardní ošetření pomalou desikací (*); současná kombinace chladového ošetření a ošetření pomalou desikací (*); ošetření pomalou desikací za tmy (*)).
- klíčení, klasifikace vybraných třítydenních klíčnicích rostlin
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry po 6. týdnu zrání, po ukončení kultivace na maturačních médiích v 7. týdnu zrání, po postmaturačních ošetřeních)

Experiment 4:

- 0. až 6. týden zrání- standardní PMM
- extirpce, 7. týden zrání- standardní TMM
- standardní pomalé desikační a chladové ošetření aplikované současně
- 2h aplikace- destilovaná H₂O x roztok DGJ
- klíčení- germinační médium neobsahující sacharid x 1% galaktózu, sledování počátku nástupu klíčení, měření prodlužování hypokotyly v čase, klasifikace třítydenních klíčnicích rostlin
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry po postmaturačním ošetření, po 24 a 72h od počátku imbibice)

- počet provedení 2

Zygotická embryogeneze smrku ztepilého

Experiment 5:

- Imbibice semen- destilovaná H₂O x roztok DGJ
- Klíčení- filtrační papír navlhčený v: H₂O
 - 1% roztok sacharózy
 - 1% roztok galaktózy
 - roztok DGJ
 - roztok DGJ obsahující 1% sacharózu
 - roztok DGJ obsahující 1% galaktózu
- sledování počátku nástupu klíčení
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (semena před imbibicí, 24 a 72 hodin po imbibici)
 - počet provedení 1

Somatická embryogeneze hybridu jedle *Abies alba* x *Abies numidica*

Experiment 1:

- 0. až 8. týden zrání na maturačním médiu
 - 3,16% maltóza.H₂O
 - 3% sacharóza
- 9. týden na dozrávacím médiu, 3,16% maltóza.H₂O x 3% sacharóza
- Standardní dvoutýdenní ošetření pomalou desikací
- klíčení
- Analýza obsahu endogenních rozpustných sacharidů (odběry v 0. týdnu zrání (proliferující ESM), po 4., 8., 9. týdnu zrání, po desikačním ošetření)
 - počet provedení 4, prezentovány 3

4. VÝSLEDKY

4.1. Dynamika obsahu RFO v průběhu somatické embryogeneze smrku ztepilého

4.1.1. Kumulace RFO u SE během kultivace na maturačních médiích

Zrání SE probíhalo vždy na pevném maturačním médiu (PMM) standardního složení až do konce pátého nebo šestého týdne v závislosti na typu pokusu. Poté byla zralá SE kultivována čtyři dny nebo týden na pozměněných PMM nebo tekutých maturačních médiích (TMM). Pokud byla SE po šestém týdnu zrání extirpována (označeno zkratkou ext, nebo přímo popsáno v textu), probíhala následná kultivace extirpovaných SE vždy na TMM. Kultivace ESM probíhala buďto na PMM nebo TMM. Celkový časový interval fáze zrání i se započítanou kultivací na TMM či PMM byl nejvýše sedm týdnů. Ihned po ukončení kultivace podstupovala SE postmaturační ošetření.

4.1.1.1. Kultivace SE v pozdních fázích zrání na médiích obsahujících RFO

SE smrku ztepilého zrála v závěrečném (šestém) týdnu zrání na PMM obsahujícím 1,5% sacharózu a ekvimolární množství rafinózy (PMM S+R). To za účelem obohacení spektra endogenních rozpustných sacharidů SE o RFO nezávisle na postmaturačním ošetření. Závěr zrání SE smrku ztepilého byl vybrán pro aplikaci PMM S+R z důvodu nedetekovatelné aktivity kyselých (tedy i extracelulárních) invertáz u SE v této fázi zrání (Konrádová et al., 2002). Kyselé invertázy mohou štěpit dodané RFO.

Kultivace SE na PMM S+R v šestém týdnu zrání nevedla ke kumulaci RFO v SE. Namísto RFO byla v SE detekována melibióza, tedy produkt štěpení dodané rafinózy vlivem působení kyselých invertáz (graf 1).

V následném pokusu byla SE po standardních šesti týdnech zrání na PMM extirpována a ve snaze o potlačení aktivity extracelulárních invertáz omývána po dobu 15ti minut v čerstvém médiu. Poté byla přenesena na TMM S+R médium a kultivována po dobu čtyř dnů. U obou variant s extirpovanými SE, tedy jak kultivované na TMM S+R, tak nečekaně i u kontrolní varianty, docházelo ke kumulaci RFO v nízkých hladinách (graf 2). U dvou ze tří provedení pokusu, byla hladina RFO u kontrolní varianty překvapivě vyšší oproti variantě kultivované na TMM S+R (graf 2). Sedmitýdenní zrání ESM na standardním PMM nevedlo ke kumulaci RFO v SE v detekovatelných hladinách oproti extirpované variantě kultivované sedmý týden zrání na TMM (graf 2).

Předběžné výsledky (pokus proveden pouze jednou) ukázaly, že samotná čtyřdenní kultivace ESM na TMM od počátku sedmého týdne zrání, vedla ke kumulaci RFO v SE. Pokud byla SE před kultivací na TMM extirpována, byla hladina RFO po kultivaci u SE extirpované varianty vyšší oproti SE varianty neextirpované. U ESM kultivované čtyři dny na TMM nebyla v SE detekována melibióza (graf 5).

Extirpovaná i neextirpovaná SE kultivovaná na TMM po šestém týdnu zrání se vždy vyznačovala vyššími hladinami sacharózy a vyšším poměrem sacharózy ku hexózám. Z tohoto důvodu a z důvodu kumulace RFO již na konci zrání, se extirpce a kultivace SE na TMM po šestém týdnu zrání staly standardním ošetřením SE v mých pokusech (vyjma pokusu, kde byly aplikovány různé koncentrace myo-inositolu do TMM).

4.1.1.2. Kultivace SE v pozdních fázích zrání na médiích obsahujících prekurzory syntézy RFO

Za účelem posílení syntézy RFO během postmaturačních ošetření byla SE kultivována na TMM obsahujících prekurzory syntézy RFO. Endogenní hladiny myo-inositolu v SE byly navýšeny přenesením ESM z PMM po pátém týdnu zrání na TMM s různými koncentracemi myo-inositolu (0,1% (standardní maturační médium), 0,2%, 0,6% a 1%). Kultivace byla ukončena po jednom týdnu (graf 4). V případě prvního provedení pokusu rostly endogenní hladiny myo-inositolu SE s narůstající koncentrací myo-inositolu v médiu v porovnání s kontrolní variantou 1,6x, 2,3x a 6x (u SE poslední varianty nebylo možné oddělit myo-inositol od fruktózy- hodnota udává součet obou hladin) versus 1,4x, 1,8x a 2,5x u opakování pokusu (graf 4). Při přenesení ESM po pátém týdnu zrání na TMM, nedocházelo během týdenní kultivace ke kumulaci RFO v SE (graf 4).

V dalším pokusu byla SE po šestém týdnu zrání na PMM extirpována a kultivována jeden týden na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy pouze 1% galaktózu (TMM Gal). Záměrem bylo zvýšení endogenní hladiny galaktózy v embryích a potenciální posílení syntézy RFO během následných postmaturačních ošetření. Hladiny RFO po týdenní kultivaci na TMM Gal byly u SE ve srovnání s kontrolou nízké a variabilní (tab. 3A,B). Po kultivaci na TMM Gal byla u SE překvapivě nízká i samotná endogenní hladina galaktózy. U SE této varianty došlo k mírnému snížení celkového obsahu endogenních rozpustných sacharidů a k nárůstu hladiny myo-inositolu ve srovnání s kontrolní variantou (graf 3).

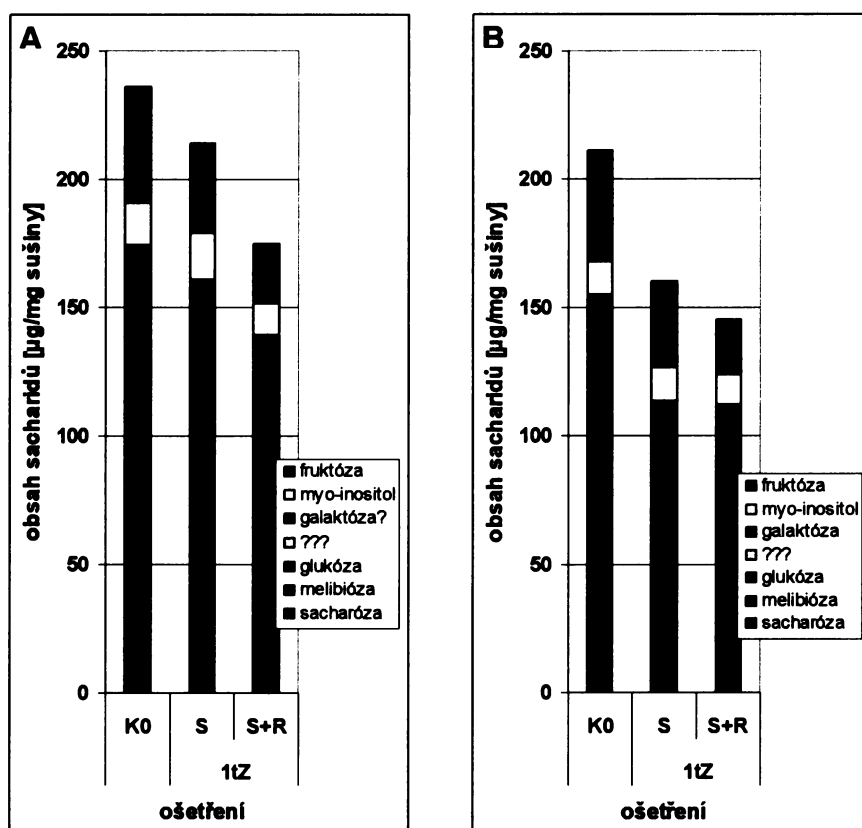
V případě týdenní kultivace šestitýdenních extirpovaných SE na TMM neobsahujícím sacharid (TMM 0) došlo také k nárůstu hladiny myo-inositolu oproti kontrolní variantě. Pokles

celkové hladiny endogenních rozpustných sacharidů způsobený snížením hladiny sacharózy byl u SE varianty kultivované na TMM 0 výrazný ve srovnání s kontrolní i Gal variantou (graf 3).

Graf 1: Vliv kultivace na pevném maturačním S+R médiu v 6. týdnu zrání na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE.

-A, B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu,

t= týden, Z= zrání, SE= somatická embrya, K0= SE po 5t zrání na PMM, S= SE kultivovaná v 6.t zrání na TMM obsahující 3% sacharózu, S+R= SE kultivovaná v 6.t zrání na PMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O, průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 1A

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								
		RFO	sacharóza	melibióza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
	K0	0,0 ± 0,0	142,3 ± 17,7	0,0 ± 0,0	32,0 ± 5,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	45,1 ± 8,6	16,7 ± 2,1	236,1 ± 28,9
	K	0,0 ± 0,0	135 ± 17,3	0,0 ± 0,0	25,5 ± 8,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	34,7 ± 8,3	18,3 ± 3,5	213,8 ± 32,9
1tZ	S+R	0,0 ± 0,0	112,1 ± 6,1	12,7 ± 1,4	12,4 ± 2,0	1,2 ± 0,6	0,6 ± 0,4	23,2 ± 3,7	12,5 ± 0,8	174,7 ± 9,7

Tabulka dat ke grafu 1B

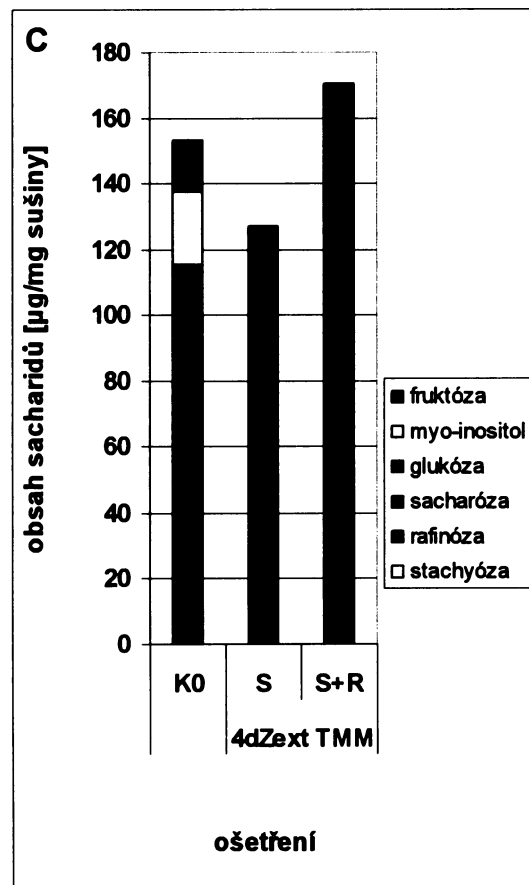
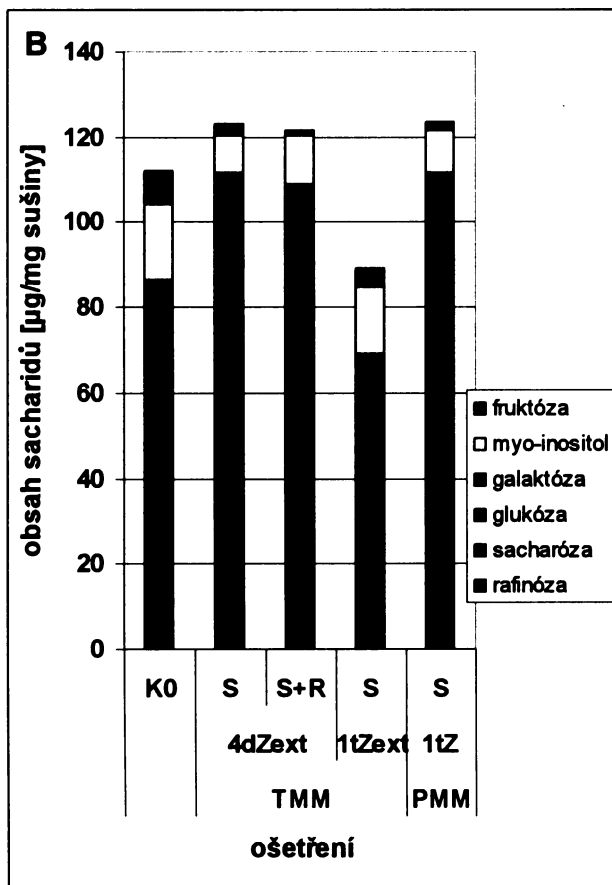
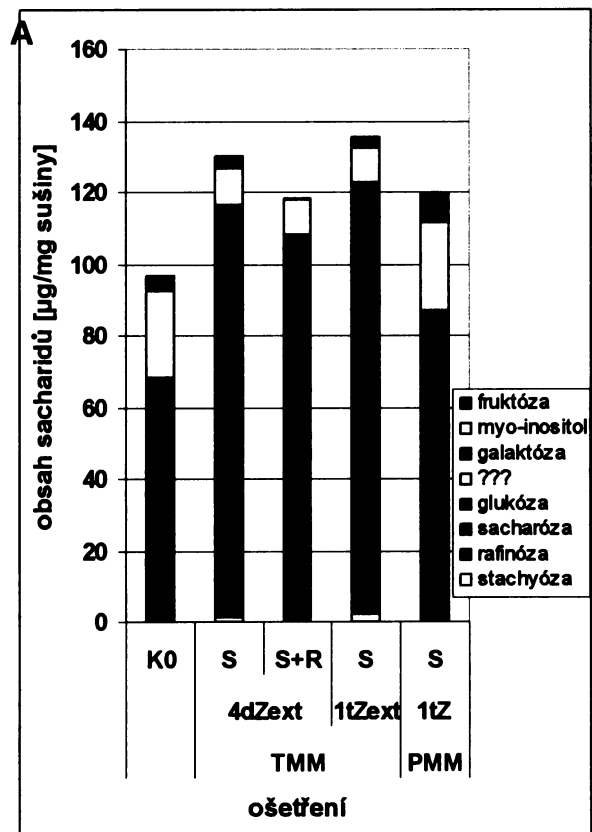
ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								
		RFO	sacharóza	melibióza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
	K0	0,0 ± 0,0	127,9 ± 8,7	0,0 ± 0,0	27,1 ± 6,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,7 ± 1,0	43,6 ± 1,0	211,2 ± 21,6
	K	0,0 ± 0,0	98,8 ± 12,1	0,0 ± 0,0	13,7 ± 2,1	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4	13,0 ± 2,9	33,6 ± 2,9	160,4 ± 18,0
1tZ	S+R	0,0 ± 0,0	85,2 ± 7,2	16,4 ± 1,6	8,3 ± 1,2	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,3	11,8 ± 0,9	21,1 ± 0,9	145,0 ± 11,2

Graf 2: Vliv změn zastoupení sacharidů v maturačním médiu na obsah endogenních rozpustných sacharidů u SE.

-A,B,C prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu,

SE= somatická embrya, d= den, t= týden, Z= zrání, ext= extirpovaná SE, TMM= tekuté maturační médium, PMM= pevné maturační médium, K0= SE po šesti týdnech zrání na PMM, S= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na standardním TMM (3% sacharóza), S+R= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu. 5H₂O.

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 2A

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]									
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah	
	K0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	64,2 ± 6,5	2,5 ± 0,3	0,4 ± 0,7	0,9 ± 0,4	24,5 ± 3,8	4,1 ± 7,7	96,7 ± 9,7	
TMM	4dZext	8	1,15 ± 0,24	2,52 ± 0,50	109,3 ± 13,3	3,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	10,2 ± 2,0	130,1 ± 15,9	
		8+R	0,00 ± 0,00	1,39 ± 0,37	104,3 ± 15,0	1,4 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4	10,0 ± 2,6	0,1 ± 0,1	118,2 ± 17,5
	1dZext	8	2,37 ± 0,48	3,62 ± 0,47	113,0 ± 7,5	1,6 ± 0,3	0,81 ± 1,16	1,2 ± 0,4	10,0 ± 1,0	135,3 ± 8,8	
PMM	1dZ	8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	80,2 ± 17,6	6,8 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	24,7 ± 5,1	8,0 ± 1,9	119,7 ± 27,7

Tabulka dat ke grafu 2B

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]									
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah	
	K0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	80,8 ± 7,5	0,0 ± 0,0	4,7 ± 1,7	0,7 ± 0,4	18,0 ± 2,0	7,7 ± 3,0	111,8 ± 12,6	
TMM	4dZext	8	0,00 ± 0,00	0,71 ± 0,22	107,5 ± 26,6	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,3	0,5 ± 0,2	8,8 ± 3,4	2,5 ± 0,4	122,9 ± 30,8
		8+R	0,00 ± 0,00	1,02 ± 0,62	106,1 ± 36,3	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,5	0,6 ± 0,1	11,5 ± 2,8	1,3 ± 1,3	121,5 ± 42,4
	1dZext	8	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,60	107,9 ± 9,9	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,8	0,5 ± 0,1	10,1 ± 0,7	2,0 ± 0,3	123,5 ± 9,3
PMM	1dZ	8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	65,1 ± 2,6	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,8	0,9 ± 0,3	15,9 ± 0,8	4,5 ± 0,7	89,3 ± 2,4

Tabulka dat ke grafu 2C

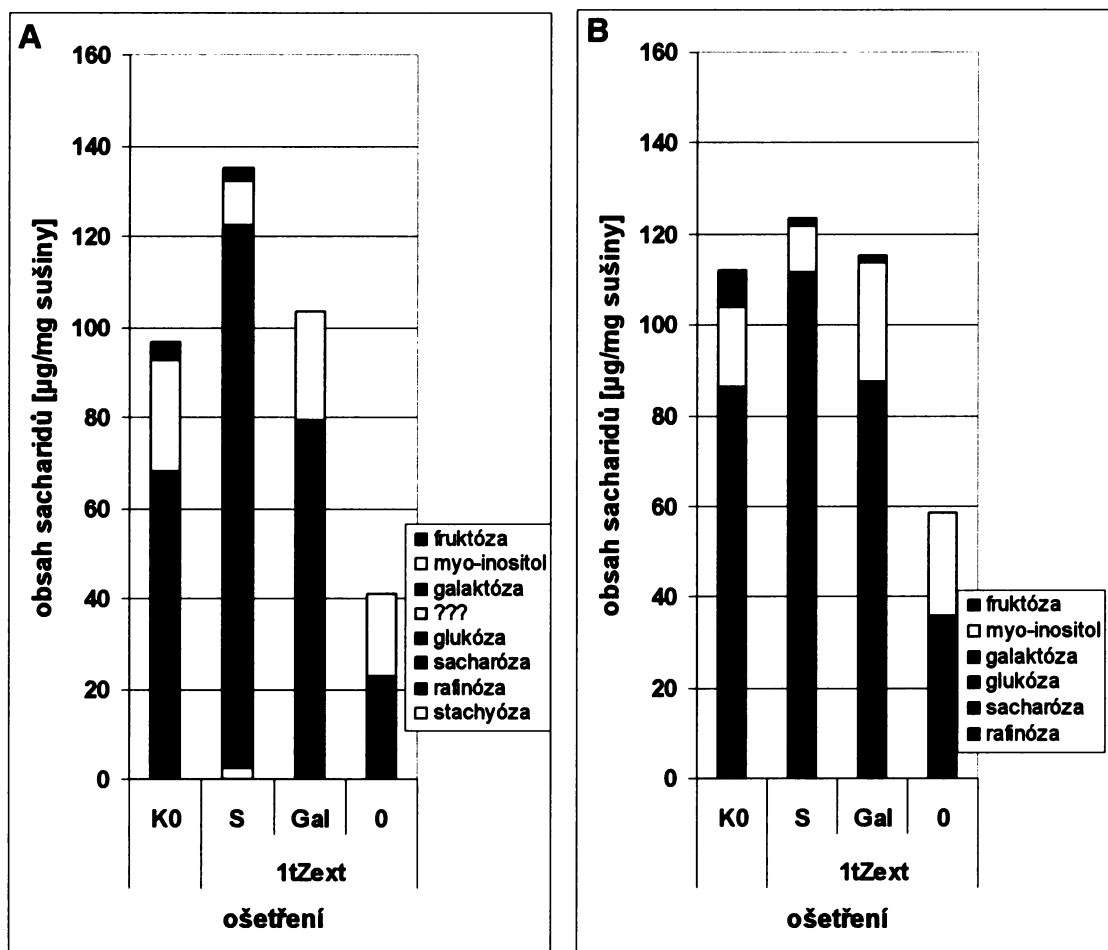
ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]							
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah	
	K0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	102,3 ± 12,6	12,9 ± 2,6	22,2 ± 1,7	16,0 ± 4,3	153,4 ± 19,7	
TMM	4dZext	8	0,7 ± 0,5	1,9 ± 0,4	107,7 ± 6,0	4,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	11,7 ± 1,2	126,9 ± 8,5
		8+R	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	150,1 ± 13,8	2,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	16,1 ± 2,0	170,2 ± 16,2

Graf 3: Vliv změn zastoupení sacharidů v maturačním médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE.

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, d= den, t= týden, Z= zrání, K0= SE po šesti týdnech zrání na PMM, S= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na standardním TMM (3% sacharóza), Gal= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy 1% galaktózu, 0= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM neobsahujícím sacharid.

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 3A

ošetření	obsah sacharidů [µg/mg sušiny]									
	stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah	
K0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	64,2 ± 6,5	2,5 ± 0,3	0,4 ± 0,7	0,9 ± 0,4	24,5 ± 3,8	4,1 ± 7,7	96,7 ± 9,7	
1tZent	S	2,37 ± 0,48	3,62 ± 0,47	113,0 ± 7,5	1,6 ± 0,3	0,81 ± 1,16	1,2 ± 0,4	10,0 ± 1,0	3,0 ± 0,5	103,6 ± 8,8
	Gal	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,23	74,6 ± 24,7	2,6 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,7	24,1 ± 6,0	0,3 ± 0,4	103,6 ± 32,1
	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	22,0 ± 5,6	0,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	18,2 ± 3,2	0,0 ± 0,0	41,0 ± 8,7

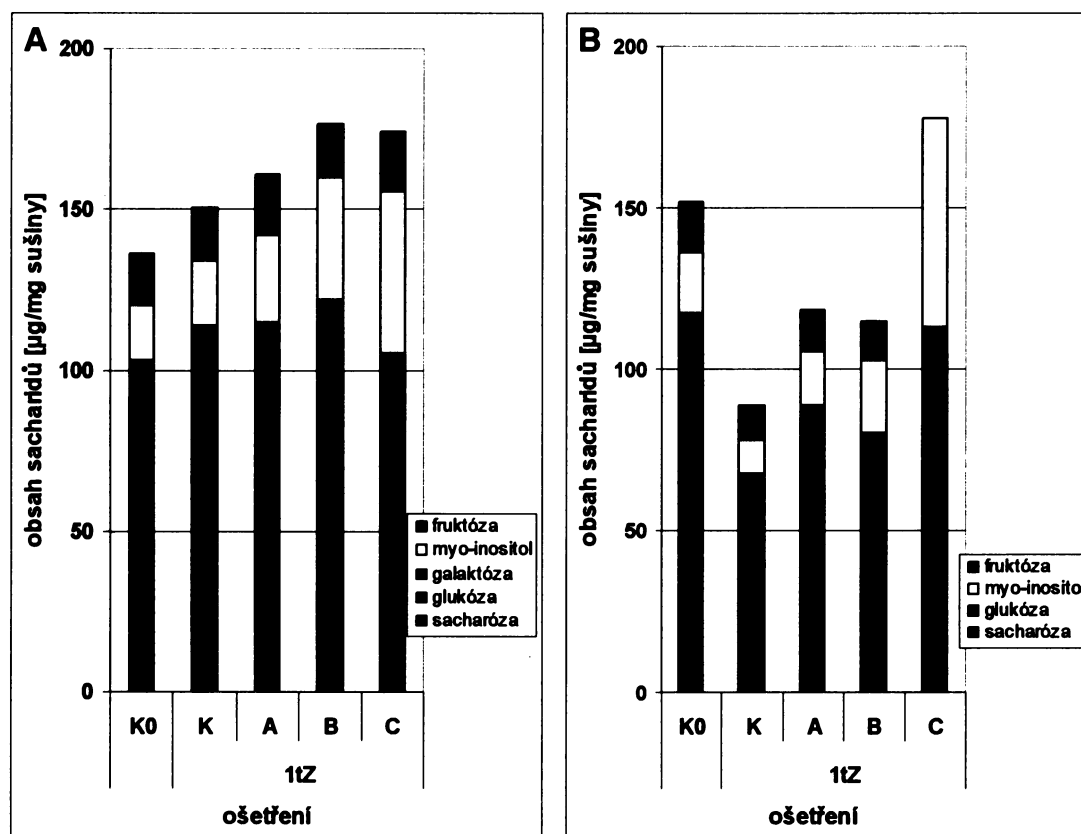
Tabulka dat ke grafu 3B

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]							
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
1tZ	K0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	80,8 ± 7,5	4,7 ± 1,7	0,7 ± 0,4	18,0 ± 2,0	7,7 ± 3,0	111,8 ± 12,6
	K	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,60	107,9 ± 9,9	2,2 ± 0,8	0,5 ± 0,1	10,1 ± 0,7	2,0 ± 0,3	123,5 ± 9,3
	A	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,10	83,0 ± 9,1	1,5 ± 0,8	2,8 ± 0,5	26,2 ± 4,4	1,6 ± 3,6	115,3 ± 12,5
	B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	34,4 ± 4,9	1,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1	22,5 ± 4,0	0,0 ± 0,0	58,4 ± 9,1

Graf 4: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů SE po kultivaci na maturačních médiích s různými hladinami myo-inositolu.

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, t= týden, Z= zrání, K0= SE po 5.t zrání na PMM, K, A, B, C= SE kultivovaná v 6.t zrání na TMM obsahujícím standardní 0,1% (K) nebo 0,2% (A), 0,6% (B), 1% (C) myo-inositol, průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 4A

		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]							
obětí		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
K0 (SZ)		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	85,4 ± 10,7	16,8 ± 3,0	0,6 ± 0,1	17,2 ± 3,0	16,0 ± 3,3	136,0 ± 18,3
1Z	K	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	94,6 ± 6,8	19,2 ± 2,3	0,0 ± 0,0	20,1 ± 2,1	16,5 ± 1,9	150,5 ± 10,7
	A	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	90,8 ± 14,7	23,8 ± 6,2	0,0 ± 0,0	27,6 ± 4,5	18,5 ± 4,5	160,7 ± 26
	B	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,5 ± 4,7	21,4 ± 4,3	0,0 ± 0,0	37,9 ± 3,7	17,0 ± 4,2	176,8 ± 16,4
	C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	81,5 ± 9,3	23,7 ± 3,4	0,0 ± 0,0	50,4 ± 6,6	18,7 ± 3,2	174,2 ± 20

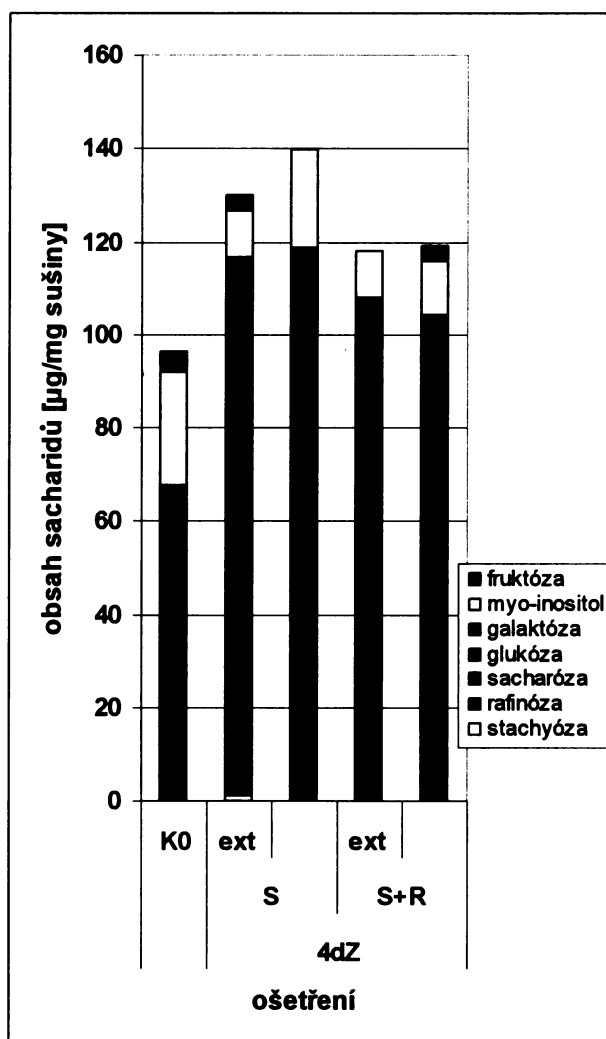
Tabulka dat ke grafu 4B

		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]						
obětí		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
K0 (SZ)		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	98,2 ± 11,6	19,2 ± 2,9	18,5 ± 2,5	15,9 ± 1,6	151,8 ± 16,5
1Z	K	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	57,3 ± 13,1	10,2 ± 1,5	10,3 ± 2,1	10,5 ± 0,9	88,4 ± 16,2
	A	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	75,8 ± 11,6	12,5 ± 3,3	16,8 ± 1,6	12,8 ± 3,6	118,0 ± 17,6
	B	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	67,1 ± 3,4	12,8 ± 4,1	22,7 ± 63,1	12,0 ± 3,5	114,6 ± 13,4
	C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	92,4 ± 8,6	17,5 ± 5,4	63,1 ± 11,1	0,0 ± 0,0	173,1 ± 23,8

Graf 5: Vliv extirpce na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po kultivaci na maturačních médiích s rozdílným zastoupením sacharidů.

SE= somatická embrya, d= den, Z= zrání, ext= extirpovaná SE (pokud není zkratka ext přítomna, jedná se automaticky o kultivaci celé ESM), K0= SE po šesti týdnech zrání na PMM, S= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 5

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
K0		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	64,2 ± 6,5	2,5 ± 0,3	0,9 ± 0,4	24,5 ± 3,8	4,1 ± 7,7	96,7 ± 9,7
4dZ	ext	1,15 ± 0,24	2,52 ± 0,50	109,3 ± 13,3	3,0 ± 0,8	0,7 ± 0,4	10,2 ± 2,0	3,3 ± 1,0	130,1 ± 15,9
	S	0,38 ± 0,11	1,22 ± 0,24	113,6 ± 14,6	2,7 ± 0,9	0,8 ± 0,6	21,1 ± 4,7	0,0 ± 0,0	139,8 ± 18,7
	ext	0,00 ± 0,00	1,39 ± 0,37	104,3 ± 15,0	1,4 ± 1,0	0,8 ± 0,4	10,0 ± 2,6	0,1 ± 0,1	118,2 ± 17,5
	S+R	0,00 ± 0,00	1,04 ± 0,15	101,0 ± 11,7	1,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1	11,5 ± 1,6	3,3 ± 1,2	119,2 ± 14,7

4.1.2. Kumulace RFO v SE během postmaturačních ošetření

Ve snaze zvýšit hladiny RFO u SE smrku ztepilého, byla zralá SE vystavena různým druhům jednotlivých postmaturačních ošetření, případně jejich kombinacím.

4.2.1.1. Standardní ošetření pomalou desikací

V případě desikačního ošetření SE s různými endogenními hladinami myo-inositolu došlo k nejvyšší kumulaci RFO u SE kultivovaných na maturačním médiu obsahujícím 0,2% myo-inositol (graf 6).

Kultivace extirpovaných SE na pozměněných TMM (S+R a Gal) nevedla k předpokládaným rozdílům ve výsledných hladinách RFO po desikačním ošetření ve srovnání s kontrolními variantami (graf 7). Nahrazení standardní světelné periody 16 h světlo/ 8 hodin tma při desikačním ošetření za stálou tmou vedlo u SE k poklesu celkové hladiny endogenních rozpustných sacharidů ve srovnání s kontrolní variantou. Celková hladina RFO u SE desikovaných ve tmě byla srovnatelná s ostatními desikovanými variantami. SE desikovaná za tmy se odlišovala od kontrolní varianty vyšším poměrem hladin stachyóza:rafinóza (graf 7).

4.2.1.2. Desikační ošetření při 97% relativní vzdušné vlhkosti

Somatická embrya kultivovaná čtyři dny na TMM (standardního složení nebo S+R) po šestidenním zrání na PMM, podstoupila desikační ošetření v prostředí 97% RH. Po desátém dni ošetření byl obsah vody embryí snížen na hodnotu kolem 25 %. Během ošetření docházelo k hnědnutí SE, které se s postupující desikací prohlubovalo. Z tohoto důvodu bylo ošetření předčasně ukončeno po deseti dnech. Urychlená dehydratace pletiv vedla ke kumulaci RFO a zvýšení celkové hladiny sacharidů u SE srovnatelnými s ošetřením pomalou desikací. Spektrum endogenních rozpustných sacharidů u desikačně ošetřených SE při 97% RH se odlišovalo od standardního desikačního ošetření kumulací neznámého sacharidu a nedetekovatelnými hladinami myo-inositolu (graf 8).

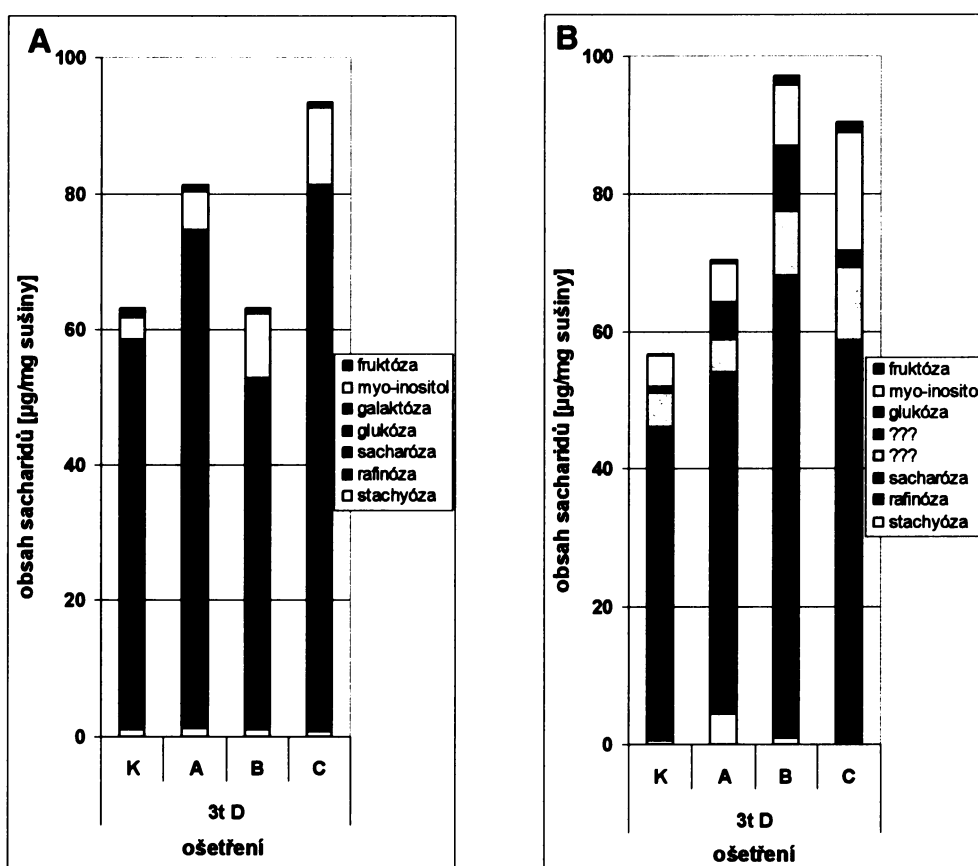
Graf 6: Vliv změn endogenních hladin myo-inositolu na obsah endogenních rozpustných sacharidů po standardním ošetření SE pomalou desikací.

(výchozí spektrum endogenních rozpustných sacharidů SE před desikačním ošetřením viz. graf 4A resp. 4B)

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, t= týden, D= standardní ošetření pomalou desikací, K, A, B, C= SE kultivovaná v 6.t zráni na TMM obsahujícím standardní 0,1% (K) nebo 0,2% (A), 0,6% (B), 1% (C) myo-inositol.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 6A

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
desikace	K	1,1 ± 0,9	3,3 ± 1,6	50,6 ± 11,1	2,3 ± 0,8	1,2 ± 0,4	3,4 ± 1,0	1,3 ± 0,4	63,2 ± 15,4
	A	1,2 ± 0,4	5,6 ± 1,4	65,0 ± 17,6	1,9 ± 0,4	1,0 ± 0,2	5,6 ± 0,8	1,1 ± 0,9	81,4 ± 18,3
	B	1,0 ± 0,3	2,9 ± 0,7	46,0 ± 14,0	2,1 ± 0,9	0,9 ± 0,3	9,5 ± 2,2	0,7 ± 0,5	63,1 ± 17,1
	C	0,8 ± 0,5	3,3 ± 0,4	74,5 ± 11,3	2,0 ± 1,0	0,7 ± 0,3	11,3 ± 1,6	0,8 ± 0,6	93,4 ± 12,3

Tabulka dat ke grafu 6B

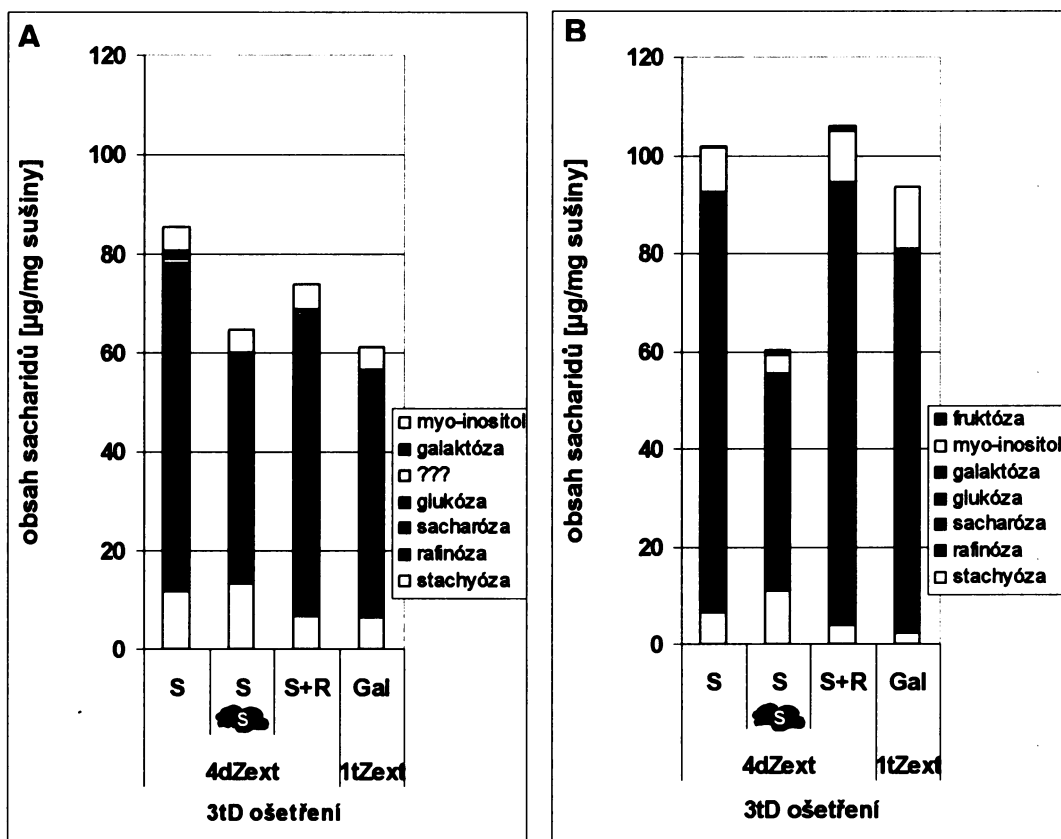
ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	???	???	glukóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
desikace	K	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,3	39,0 ± 4,5	4,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,2	4,2 ± 0,5	0,2 ± 0,2	51,3 ± 5,4
	A	4,8 ± 0,9	3,7 ± 0,8	48,9 ± 11,0	5,1 ± 1,5	3,6 ± 2,1	2,2 ± 2,2	6,3 ± 1,0	0,5 ± 0,5	75,1 ± 14,0
	B	1,0 ± 1,1	3,1 ± 1,2	60,0 ± 23,4	8,8 ± 6,3	3,7 ± 1,9	5,2 ± 8,4	8,3 ± 4,7	1,2 ± 0,5	91,4 ± 36,7
	C	0,2 ± 0,2	2,0 ± 1,0	56,5 ± 27,2	10,6 ± 5,7	0,7 ± 1,3	1,8 ± 0,9	17,0 ± 8,3	1,6 ± 0,9	90,4 ± 42,6

Graf 7: Vliv změn zastoupení sacharidů v maturačním médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po standardním ošetření pomalou desikací.

-A,B prezentují data z jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, D= standardní ošetření pomalou desikací, d= den, t= týden, Z= zrání, ext= extirpovaná SE, S= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O, Gal= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy 1% galaktózu, **S** = ošetření pomalou desikací za tmy.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 7A

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
4dZext	S	11,8 ± 4,0	6,2 ± 1,0	55,9 ± 5,3	4,2 ± 1,6	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,4	4,9 ± 0,8	0,0 ± 0,0	85,8 ± 9,4
	tna S	13,3 ± 2,2	2,7 ± 0,7	35,4 ± 7,8	7,2 ± 1,6	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4	4,9 ± 2,3	0,0 ± 0,0	64,8 ± 10,2
	S+R	6,8 ± 1,6	5,1 ± 1,3	51,8 ± 6,4	3,9 ± 1,6	0,1 ± 0,2	1,3 ± 0,7	4,9 ± 1,0	0,0 ± 0,0	73,9 ± 9,4
1tZext	Gal	6,3 ± 2,2	4,3 ± 1,4	40,7 ± 7,6	4,0 ± 1,7	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,3	4,9 ± 1,2	0,0 ± 0,0	61,3 ± 11,8

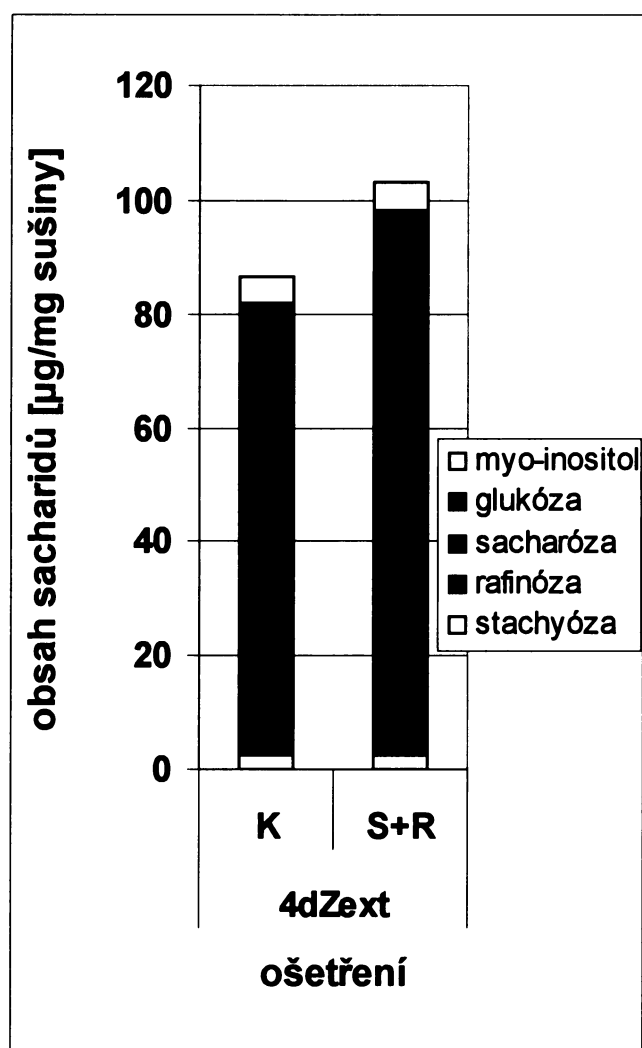
Tabulka dat ke grafu 7B

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
4dZext	S	6,5 ± 2,0	5,3 ± 1,5	73,7 ± 14,2	5,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,7	8,8 ± 1,9	0,3 ± 0,6	101,6 ± 19,6
	tna S	10,8 ± 1,3	2,4 ± 0,7	34,3 ± 5,2	7,1 ± 1,1	1,5 ± 2,4	0,7 ± 0,4	4,1 ± 0,7	0,9 ± 1,9	61,8 ± 3,6
	S+R	3,7 ± 1,3	7,0 ± 2,0	78,3 ± 17,1	2,9 ± 1,7	0,0 ± 0,0	2,5 ± 1,8	10,6 ± 5,4	0,9 ± 1,3	105,9 ± 24,7
1tZext	Gal	2,2 ± 0,5	7,5 ± 2,2	67,0 ± 16,5	3,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0	1,3 ± 1,3	12,7 ± 4,5	0,0 ± 0,0	93,6 ± 23,9

Graf 8: Vliv změn zastoupení sacharidů v maturačním médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po desikačním ošetření při 97% relativní vzdušné vlhkosti.

SE= somatická embrya, d= den, Z= zrání, ext= extirpovaná SE, K= kontrolní varianty- SE kultivovaná od počátku 7.t zrání po 4 dny na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= SE kultivovaná po 4 dny od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 8

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]						
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo-inositol	fruktóza	celkový obsah
4dZext	K	2,5 ± 1,3	15,4 ± 7,6	63,3 ± 7,8	0,8 ± 0,3	4,5 ± 1,8	0,0 ± 0,0	86,5 ± 14,4
	S+R	2,7 ± 1,5	16,6 ± 9,8	77 ± 65,4	1,9 ± 1,3	5,2 ± 4,5	0,0 ± 0,0	103,4 ± 81,9

4.2.1.3. Chladové ošetření

Vliv změn zastoupení sacharidů v TMM na hladiny RFO u SE byl testován také během chladového ošetření. Chladové ošetření se liší od desikačního ošetření svým základním uspořádáním. SE zůstávají po celou dobu chladového ošetření na maturačním médiu od poslední subkultivace během zrání. Působení pozměněných TMM na SE během chladového ošetření se tak od desikačního výrazně odlišuje.

Nejvyšších hladin RFO po chladovém ošetření bylo dosaženo u varianty kultivované na TMM obsahujícím 0,2% myo-inositol a v případě opakování pokusu na TMM obsahujícím 0,6% myo-inositol (graf 9).

Zralá SE byla po šesti týdnech zrání probíhajícího na standardním PMM extirpována a dále kultivována čtyři dny na TMM S+R nebo jeden týden na TMM Gal. Poté byla SE chladově ošetřena. Kultivace SE na TMM S+R (graf 10) ani na TMM Gal (graf 11) nepřispěla k navýšení výsledných hladin RFO po chladovém ošetření oproti příslušným kontrolním variantám. Prodloužení chladového ošetření u varianty TMM S+R a její kontrolní varianty ze tří na šest týdnů vedlo pouze k mírnému nárůstu hladin RFO (graf 10). Podle předběžných výsledků byla tendence nárůstu hladin RFO u SE kultivovaných na TMM Gal při prodlouženém chladovém ošetření obdobná. Prodloužení chladového ošetření u SE smrku ztepilého ze tří na šest týdnů vedlo ke snížení hladin celkových rozpustných sacharidů. U SE varianty TMM 0 došlo během chladového ošetření ke kumulaci hladiny RFO srovnatelné se situací u kontrolní varianty (graf 14). Celkově lze hodnotit dosažené hladiny RFO u SE po chladovém ošetření jako nízké a variabilní.

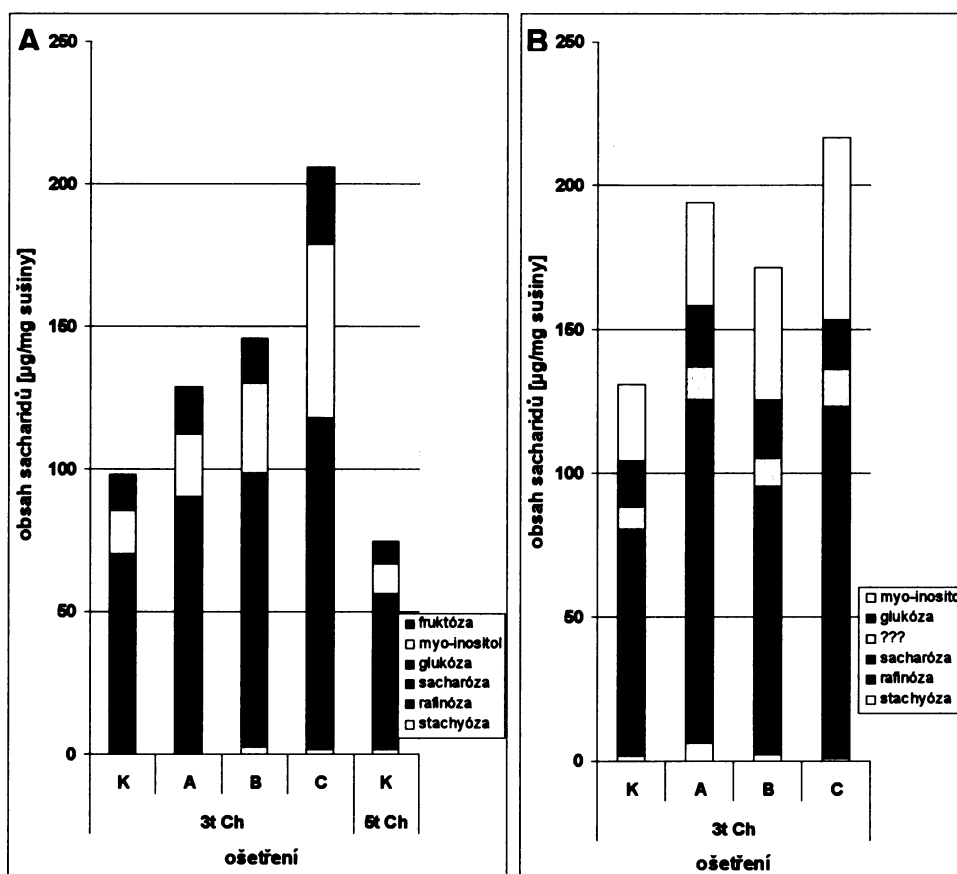
Graf 9: Vliv změn endogenních hladin myo-inositolu na obsah endogenních rozpustných sacharidů u SE po chladovém ošetření.

(výchozí spektrum endogenních rozpustných sacharidů SE před chladovým ošetřením viz. graf 4A resp. 4B)

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, t= týden, Ch= chladové ošetření, K, A, B, C= SE kultivovaná v 6.t zrání na TMM obsahujícím standardní 0,1% (K) nebo 0,2% (A), 0,6% (B), 1% (C) myo-inositol.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 9A

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]						celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo-inositol	fruktóza	
3t Ch	K	0,6 ± 0,7	2,2 ± 1,1	55,9 ± 11,3	11,4 ± 4,2	15,5 ± 4,4	12,7 ± 3,8	98,4 ± 21,2
	A	0,5 ± 1,0	2,6 ± 1,7	69,3 ± 9,4	17,9 ± 5,3	21,9 ± 5,5	16,5 ± 5,9	128,7 ± 24,1
	B	2,6 ± 1,9	5,9 ± 2,0	69,8 ± 5,2	20,3 ± 6,3	31,6 ± 6,1	15,9 ± 3,6	146,0 ± 21,4
	C	1,6 ± 1,2	4,1 ± 3,1	80,9 ± 4,7	31,3 ± 7,0	61,4 ± 10,1	26,8 ± 4,8	206,1 ± 22,5
5t Ch	K	1,6 ± 0,8	3,5 ± 1,4	43,0 ± 9,4	8,0 ± 3,1	10,8 ± 2,7	7,6 ± 2,7	74,5 ± 16,7

Tabulka dat ke grafu 9B

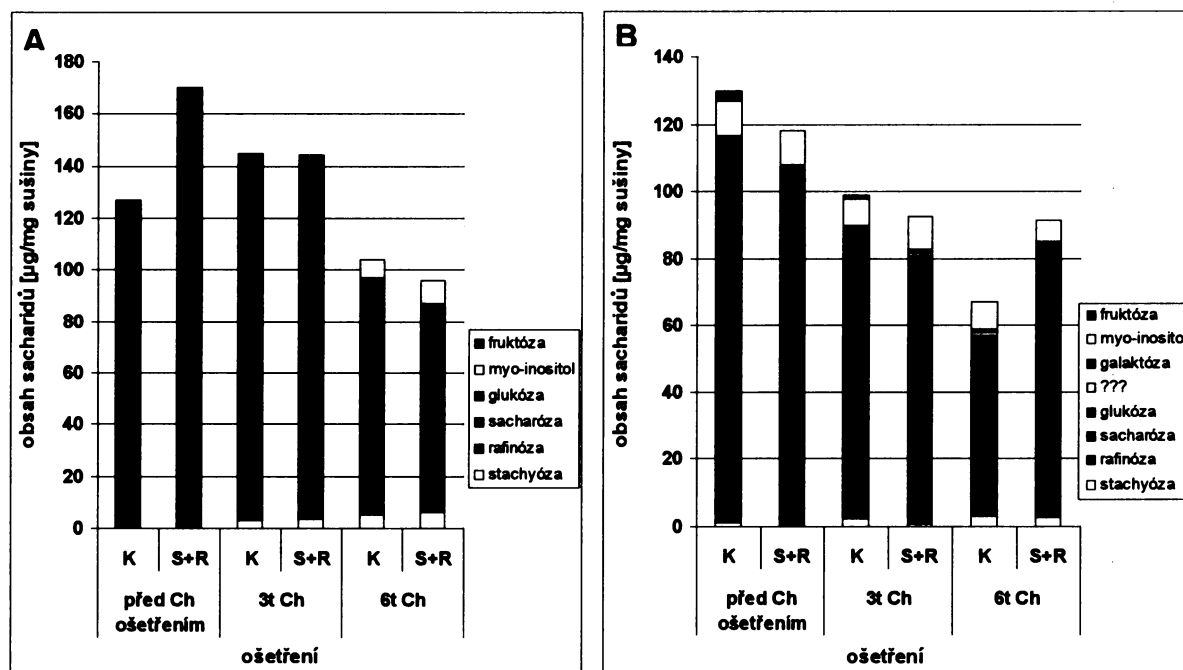
ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]						celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	???	glukóza	myo-inositol	
3t Ch	K	1,4 ± 1,7	4,2 ± 3,7	69,3 ± 17,0	7,5 ± 1,6	14,6 ± 5,9	25,0 ± 6,7	121,9 ± 33,8
	A	4,8 ± 4,1	8,1 ± 4,4	92,8 ± 7,9	10,1 ± 1,1	17,8 ± 2,3	30,7 ± 2,2	164,4 ± 17,8
	B	2,1 ± 1,2	5,7 ± 2,6	85,1 ± 15,9	9,6 ± 2,2	19,7 ± 4,1	44,8 ± 9,9	167,1 ± 30,9
	C	1,0 ± 0,7	3,6 ± 1,7	111,9 ± 23,4	12,5 ± 2,7	16,1 ± 3,8	59,8 ± 14,6	204,9 ± 41,3

Graf 10: Vliv sacharidového složení maturačního média na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po chladovém ošetření.

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

t= týden, Ch= chladové ošetření, K= kontrolní varianty- SE kultivovaná od počátku 7.t zrání po čtyři dny na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání po čtyři dny na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 10A

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]						
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
před ošetřením	K	0,7 ± 0,5	1,9 ± 0,4	107,7 ± 6,0	4,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	11,7 ± 1,2	126,9 ± 8,5
	S+R	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	150,1 ± 13,8	2,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	16,1 ± 2,0	170,2 ± 16,2
3t Ch	K	2,9 ± 0,5	5,5 ± 0,3	119,4 ± 3,8	5,3 ± 3,8	0,0 ± 0,0	11,8 ± 1,4	144,9 ± 6,2
	S+R	3,3 ± 0,8	6,8 ± 1,1	114,2 ± 7,4	5,5 ± 3,1	0,0 ± 0,0	14,3 ± 5,9	144,2 ± 9,7
6t Ch	K	5,1 ± 1,2	7,7 ± 1,1	82,2 ± 15,4	1,9 ± 0,9	7,0 ± 1,6	0,0 ± 0,0	104,0 ± 18,1
	S+R	6,4 ± 2,0	5,9 ± 1,7	70,3 ± 19,5	4,5 ± 1,3	8,6 ± 3,0	0,0 ± 0,0	95,6 ± 26,4

Tabulka dat ke grafu 10B

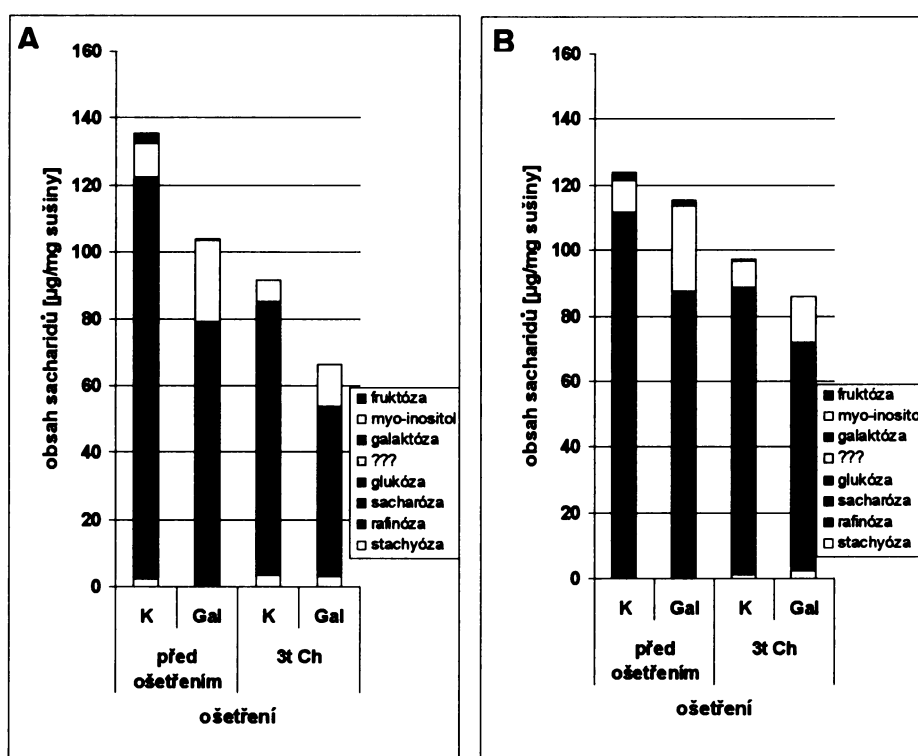
ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
před ošetřením	K	1,15 ± 0,24	2,52 ± 0,50	109,3 ± 13,3	3,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	10,2 ± 2,0	3,3 ± 1,0	130,1 ± 15,9
	S+R	0,00 ± 0,00	1,39 ± 0,37	104,3 ± 15,0	1,4 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4	10,0 ± 2,6	0,1 ± 0,1	118,2 ± 17,5
3t Ch	K	2,1 ± 0,5	4,3 ± 1,0	80,7 ± 17,3	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	7,7 ± 3,4	1,1 ± 1,8	98,8 ± 21,3
	S+R	0,6 ± 0,2	2,1 ± 0,5	76,9 ± 7,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,5	9,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0	92,6 ± 7,6
6t Ch	K	3,1 ± 1,0	3,4 ± 1,1	47,9 ± 6,3	2,4 ± 1,2	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,3	8,2 ± 2,4	0,0 ± 0,0	67,2 ± 6,7
	S+R	2,6 ± 0,5	4,5 ± 0,8	75,1 ± 12,2	1,4 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,8	6,5 ± 1,7	0,0 ± 0,0	91,5 ± 15,7

Graf 11: Vliv sacharidového složení maturačního média na spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po chladovém ošetření.

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, Ch= chladové ošetření, K= kontrolní varianty- SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, Gal= SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy 1% galaktózu.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 11A

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
před ošetřením	K	2,37 ± 0,48	3,62 ± 0,47	113,0 ± 7,5	1,6 ± 0,3	0,8 ± 1,2	1,2 ± 0,4	10,0 ± 1,0	3,0 ± 0,5	135,3 ± 8,8
	Gal	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,23	74,6 ± 24,7	2,6 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,7	24,1 ± 6,0	0,3 ± 0,4	103,6 ± 32,1
3t Ch	K	3,2 ± 1,0	4,3 ± 1,2	75,4 ± 15,0	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	6,4 ± 1,4	0,0 ± 0,0	91,5 ± 18,4
	Gal	3,0 ± 0,3	1,6 ± 0,6	38,7 ± 5,9	9,1 ± 1,4	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2	12,4 ± 1,7	0,0 ± 0,0	66,1 ± 7,8

Tabulka dat ke grafu 11B

ošetření		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
před ošetřením	K	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,60	107,9 ± 9,9	2,2 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1	10,1 ± 0,7	2,0 ± 0,3	123,5 ± 9,3
	Gal	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,10	83,0 ± 9,1	1,5 ± 0,8	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,5	26,2 ± 4,4	1,6 ± 3,6	115,3 ± 12,5
3t Ch	K	1,1 ± 0,5	2,5 ± 0,5	83,0 ± 6,3	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,1	8,5 ± 2,5	0,7 ± 0,6	97,5 ± 6,7
	Gal	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2	59,0 ± 4,0	8,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	13,6 ± 1,8	0,0 ± 0,0	85,7 ± 6,5

4.2.1.4. Tepelný šok

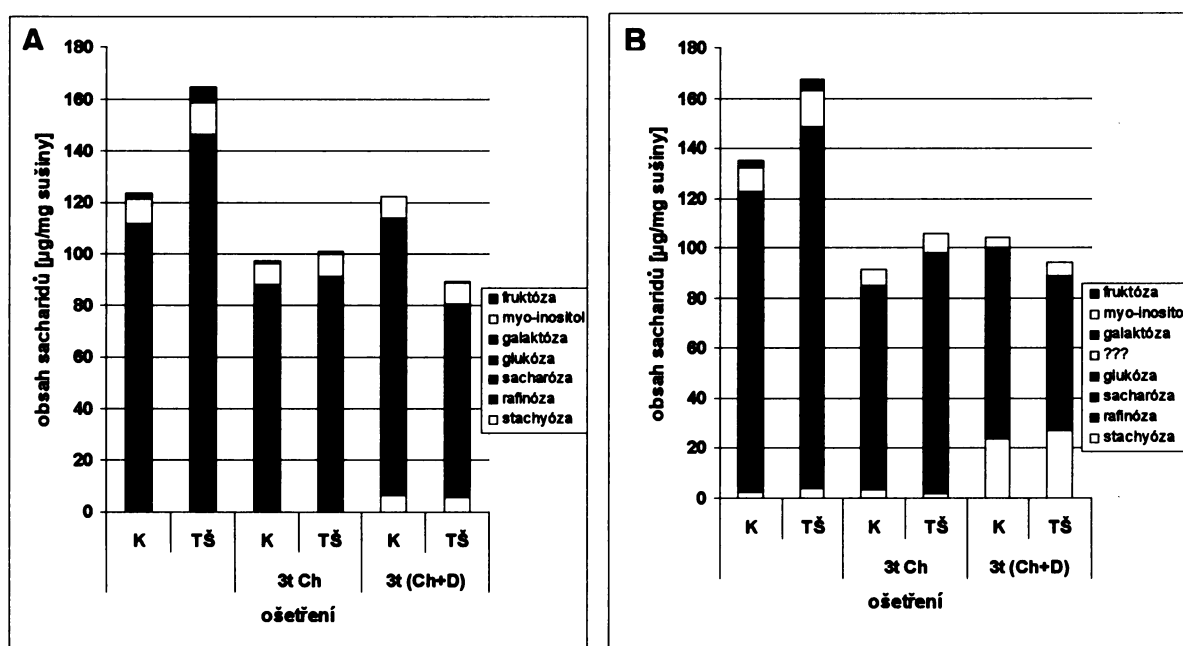
Somatická embrya smrku ztepilého byla po šesti týdnech zrání vystavena $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu jedné hodiny, následně extirpována a kultivována na standardním TMM po dobu jednoho týdne. Ošetření vedlo u SE k nárůstu hladiny sacharózy a nárůstu celkové hladiny endogenních rozpustných sacharidů ve srovnání s kontrolní variantou. RFO se kumulovalo v SE pouze u jednoho ze dvou provedení pokusu (graf 12).

Graf 12: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů po tepelného šoku a následných postmaturačních ošetřeních u SE.

-A,B prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

-tepelný šok byl aplikován po 6. t zrání, následovala týdenní kultivace extirpovaných SE na TMM

SE= somatická embrya, t= týden, Ch= chladové ošetření, K= kontrolní varianty- SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, TŠ= tepelný šok, (D+Ch)= současné chladové a pomalé desikační ošetření, průměry \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 12A

ošetření	obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								
	stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
K	0,00 \pm 0,00	0,98 \pm 0,60	107,9 \pm 9,9	2,2 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	10,1 \pm 0,7	2,0 \pm 0,3	123,5 \pm 9,3
TŠ	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	141,0 \pm 3,2	5,4 \pm 0,9	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,4	12,0 \pm 1,0	5,8 \pm 1,0	164,5 \pm 3,8
3x Ch	K	1,1 \pm 0,5	2,5 \pm 0,5	83,0 \pm 6,3	0,8 \pm 0,2	0,4 \pm 0,4	8,5 \pm 2,5	0,7 \pm 0,6	97,5 \pm 6,7
	TŠ	0,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,9	86,2 \pm 4,1	1,0 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	8,7 \pm 3,3	1,1 \pm 0,9	100,9 \pm 8,8
3x (Ch+D)	K	6,5 \pm 1,7	27,1 \pm 2,6	78,7 \pm 5,0	1,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	8,4 \pm 1,8	0,0 \pm 0,0	122,4 \pm 6,9
	TŠ	5,5 \pm 1,3	12,4 \pm 1,1	60,1 \pm 11,3	1,4 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,9 \pm 0,3	8,5 \pm 1,9	89,5 \pm 13,3

Tabulka dat ke grafu 12B

ošetření	obsah sacharidů [μg/mg sušiny]									
	stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah	
K	2,37 ± 0,48	3,62 ± 0,47	113,0 ± 7,5	1,6 ± 0,3	0,81 ± 1,16	1,2 ± 0,4	10,0 ± 1,0	3,0 ± 0,5	135,3 ± 8,8	
TŠ	3,88 ± 1,96	5,01 ± 1,61	135,9 ± 13,2	4,0 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,5 ± 2,0	4,3 ± 0,9	167,6 ± 17,9	
3C	K	3,2 ± 1,0	4,3 ± 1,2	75,4 ± 15,0	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	6,4 ± 1,4	0,0 ± 0,0	91,5 ± 18,4
	TŠ	2,0 ± 1,1	3,7 ± 0,5	90,0 ± 8,4	1,2 ± 0,6	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2	7,6 ± 1,0	0,0 ± 0,0	105,7 ± 8,9
3 (C+D)	K	23,8 ± 3,5	9,5 ± 1,2	54,1 ± 3,4	11,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,9	4,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	104,6 ± 4,6
	TŠ	27,0 ± 6,3	7,7 ± 4,5	41,7 ± 21,0	12,2 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,4	5,3 ± 1,0	0,0 ± 0,0	94,5 ± 23,1

4.2.1.5. Kombinace postmaturačních ošetření

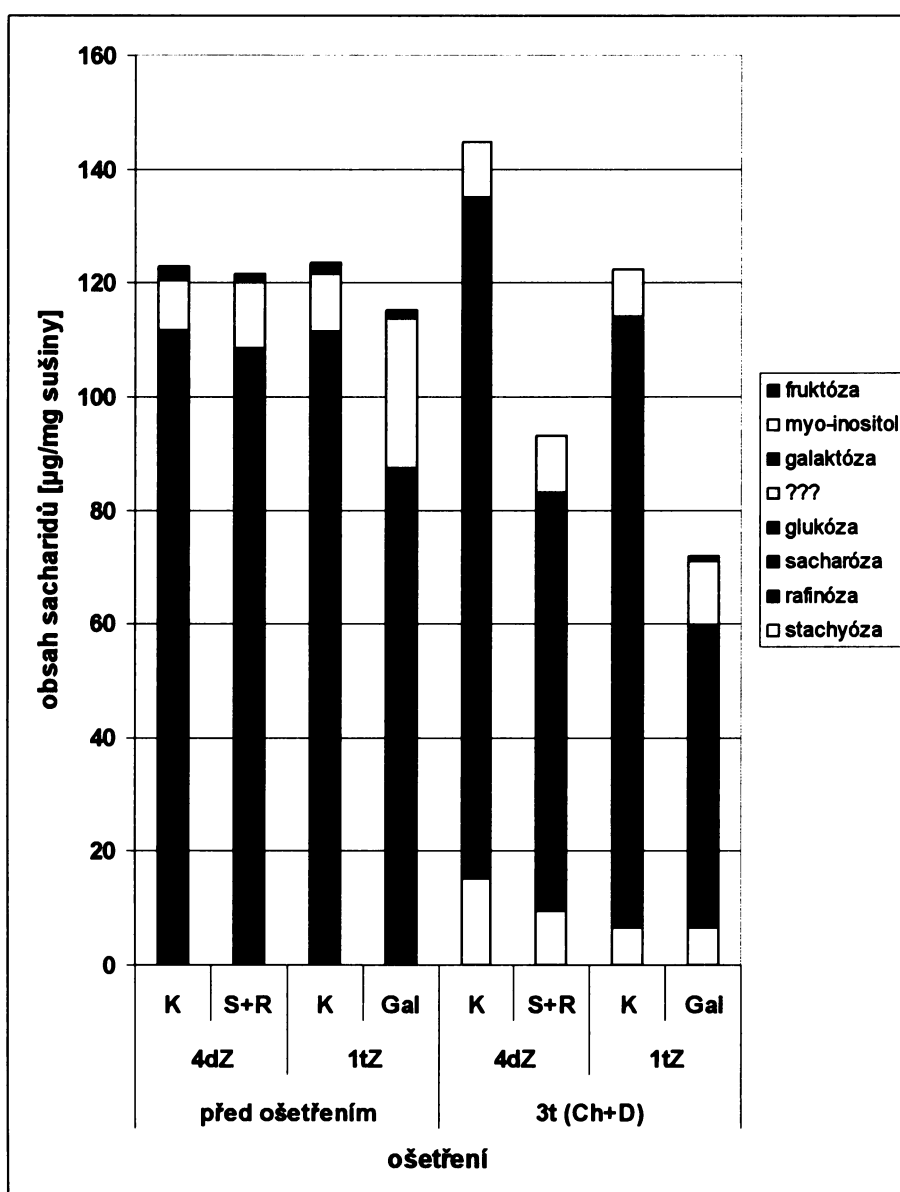
SE stejných variant, jako v případě chladového ošetření, byla vystavena chladovému a desikačnímu ošetření současně. Jiná skupina SE varianty TMM S+R a její kontrolní varianta byly vystaveny nejprve chladovému a posléze desikačnímu ošetření. Aplikace kombinací postmaturačních ošetření vedly ke kumulaci vyšších hladin RFO ve srovnání s jednotlivými postmaturačními ošetřeními (graf 13A, 13B). Celkově nejvyšších hladin RFO bylo dosaženo u SE, u nichž bylo desikační i chladové ošetření aplikováno současně (graf 12, 13A, 13B).

Současná kombinace postmaturačních ošetření extirpovaných SE variant TMM S+R a TMM Gal vedla až na několik výjimek ke kumulaci nižších hladin RFO ve srovnání s kontrolními variantami (graf 13A, 13B). Změny spektra endogenních rozpustných sacharidů u SE vyvolané tepelným šokem nevedly k navýšení hladiny RFO v kombinaci s postmaturačními ošetřeními ve srovnání s kontrolními variantami (graf 12). Pokud bylo v kombinaci s chladovým ošetřením současně aplikováno desikační ošetření při 97% RH, nedošlo ani po třech týdnech ošetření ke snížení obsahu vody u SE jako v případě aplikace samotného desetidenního desikačního ošetření při 97% RH. Také i v tomto případě docházelo k částečnému hnědnutí kultury během ošetření, ale nebylo tak rozsáhlé jako v případě samotného desikačního ošetření při 97% RH. Přestože kombinace desikačního ošetření při 97% RH a chladového ošetření aplikovaných současně navodily kumulaci RFO v SE ve vysokých hladinách (graf 15), bylo následně od tohoto ošetření z výše zmíněných důvodů upuštěno.

Graf 13A: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po kombinaci postmaturačních ošetření v závislosti na sacharidovém složení maturačního média.

SE= somatická embrya, d= den, t= týden, Z= zrání, Ch= chladové ošetření, (D+Ch)= současné chladové a pomalé desikační ošetření, K= kontrolní varianty- extirpovaná SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= extirpovaná SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O, Gal= extirpovaná SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy 1% galaktózu.

- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 13A

ošetření			obsah sacharidů [μg/mg sušiny]							
			stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
před ošetřením	4dZent	K	0,00 ± 0,00	0,71 ± 0,22	107,5 ± 26,6	3,0 ± 0,3	0,5 ± 0,2	8,8 ± 3,4	2,5 ± 0,4	122,9 ± 30,8
		S+R	0,00 ± 0,00	1,02 ± 0,62	106,1 ± 36,3	1,0 ± 1,5	0,6 ± 0,1	11,5 ± 2,8	1,3 ± 1,3	121,5 ± 42,4
		R	0,00 ± 0,00	0,98 ± 0,60	107,9 ± 9,9	2,2 ± 0,8	0,5 ± 0,1	10,1 ± 0,7	2,0 ± 0,3	123,5 ± 9,3
3t (Ch+D)	1tZent	K	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,10	83,0 ± 9,1	1,5 ± 0,8	2,8 ± 0,5	26,2 ± 4,4	1,6 ± 3,6	115,3 ± 12,5
		S+R	15,2 ± 8,3	22,0 ± 8,3	93,4 ± 13,7	2,4 ± 0,6	1,7 ± 1,4	9,6 ± 1,5	0,0 ± 0,0	144,7 ± 7,2
		R	9,4 ± 1,2	11,4 ± 2,6	57,5 ± 12,0	3,4 ± 0,9	1,2 ± 0,7	10,0 ± 1,2	0,0 ± 0,0	93,2 ± 15,2
3t (Ch+D)	1tZent	K	6,5 ± 1,7	27,1 ± 2,6	78,7 ± 5,0	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,6	8,4 ± 1,8	0,0 ± 0,0	122,4 ± 6,9
		Gal	6,5 ± 1,7	7,4 ± 1,0	40,4 ± 7,0	4,6 ± 1,4	0,7 ± 0,2	11,4 ± 2,1	0,9 ± 0,9	71,9 ± 6,7

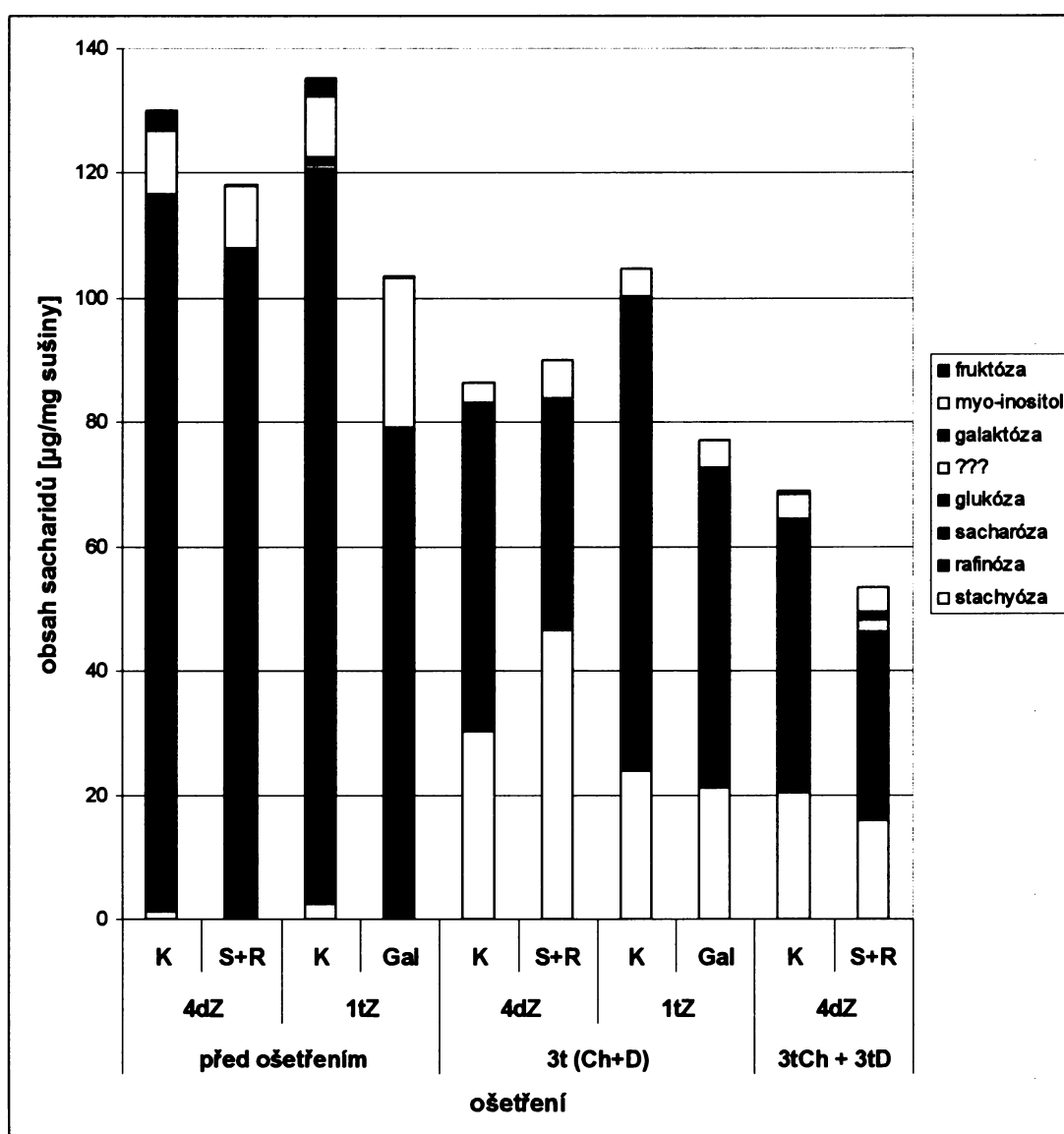
Tabulka dat ke grafu 13B- viz. níže

ošetření			obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								
			stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
před ošetřením	4dZent	K	1,15 ± 0,24	2,52 ± 0,50	109,3 ± 13,3	3,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,4	10,2 ± 2,0	3,3 ± 1,0	130,1 ± 15,9
		S+R	0,00 ± 0,00	1,39 ± 0,37	104,3 ± 15,0	1,4 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4	10,0 ± 2,6	0,1 ± 0,1	118,2 ± 17,5
		K	2,37 ± 0,48	3,62 ± 0,47	113,0 ± 7,5	1,6 ± 0,3	0,81 ± 1,16	1,2 ± 0,4	10,0 ± 1,0	3,0 ± 0,5	134,3 ± 8,8
3t (Ch+D)	1tZent	Gal	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,23	74,6 ± 24,7	2,6 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,7	24,1 ± 6,0	0,3 ± 0,4	103,6 ± 32,1
		K	30,3 ± 6,6	18,3 ± 4,8	26,6 ± 12,3	6,4 ± 1,3	0,0 ± 0,0	1,4 ± 1,7	3,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	62,9 ± 20,1
		S+R	46,5 ± 13,7	0,0 ± 0,0	20,0 ± 20,14	16,1 ± 6,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3	6,2 ± 1,5	0,0 ± 0,0	90,0 ± 35,3
3t (Ch+D)	1tZent	K	23,8 ± 3,5	9,5 ± 1,2	54,1 ± 3,4	11,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,9	4,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0	104,6 ± 4,6
		Gal	21,1 ± 9,7	4,7 ± 2,9	33,8 ± 16,5	12,5 ± 4,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,4	4,4 ± 1,1	0,0 ± 0,0	77,1 ± 20,9
3tCh + 3tD	4dZent	K	20,4 ± 4,3	7,0 ± 2,2	31,5 ± 8,6	4,2 ± 1,2	0,4 ± 0,9	0,9 ± 0,5	4,0 ± 1,3	0,4 ± 0,9	68,8 ± 17,0
		S+R	15,9 ± 2,3	5,6 ± 1,1	21,2 ± 3,3	3,4 ± 0,7	2,1 ± 0,5	1,2 ± 0,7	4,1 ± 1,2	0,0 ± 0,0	53,5 ± 7,1

Graf 13B: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po kombinaci postmaturačních ošetření v závislosti na sacharidovém složení maturačního média, opakování

SE= somatická embrya, d= den, t= týden, Z= zrání, Ch= chladové ošetření, (D+Ch)= současné chladové a pomalé desikační ošetření, K= kontrolní varianty- extirpovaná SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= extirpovaná SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O, Gal= extirpovaná SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím místo 3% sacharózy 1% galaktózu.

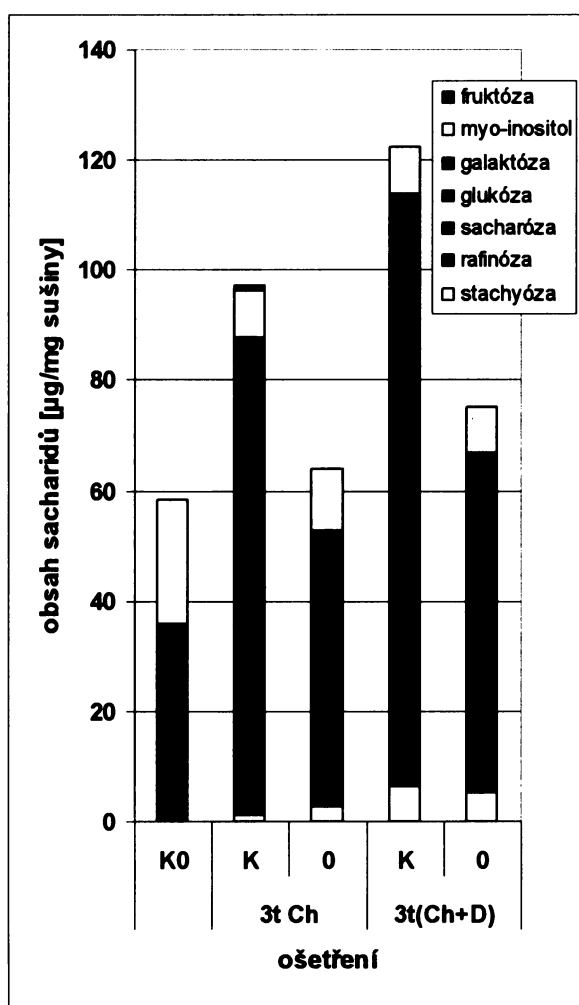
- průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce viz. výše, n = 5 až 6.



Graf 14: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE po chladovém ošetření nebo kombinaci postmaturačních ošetření v závislosti na dostupnosti sacharidu z maturačního média během zrání.

SE= somatická embrya, t= týden, Ch= chladové ošetření, (D+Ch)= současné chladové a pomalé desikační ošetření, SE= somatická embrya, K0= SE po šesti týdnech zrání na PMM, K= kontrolní varianty- extirpovaná SE kultivovaná od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, 0= SE kultivovaná od počátku sedmého týdne zrání na TMM neobsahujícím sacharid.

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



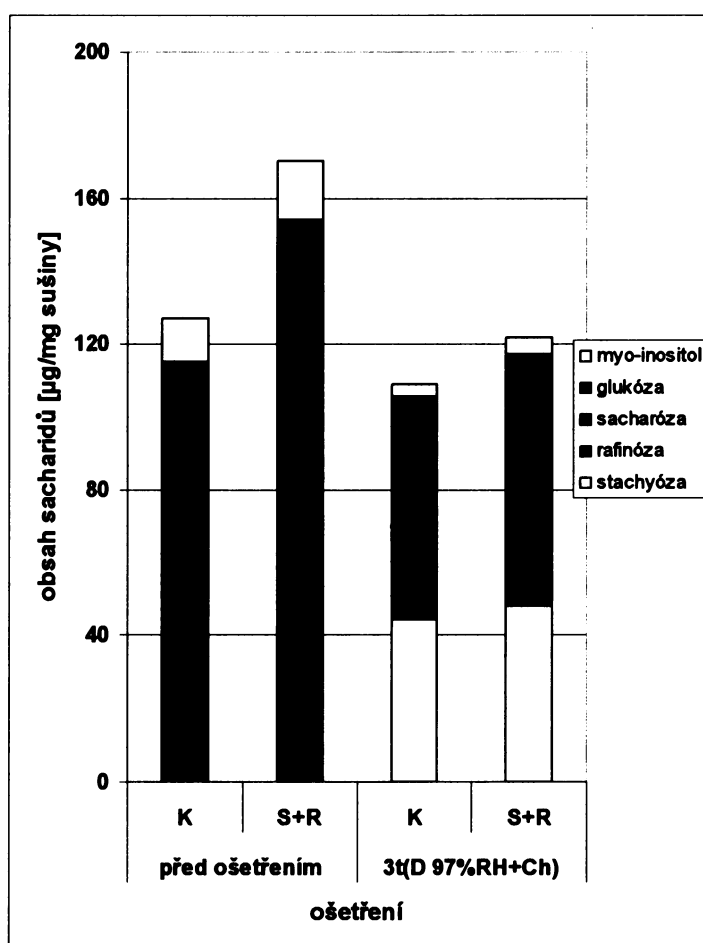
Tabulka dat ke grafu 14

ošetření	obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							celk. obsah	
	stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	galaktóza	myo-inositol	fruktóza		
K0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	34,4 ± 4,9	1,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1	22,5 ± 4,0	0,0 ± 0,0	58,4 ± 9,1	
3t Ch	K	1,1 ± 0,5	2,5 ± 0,5	83,0 ± 6,3	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	8,5 ± 2,5	0,7 ± 0,6	97,5 ± 6,7
	0	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,4	29,5 ± 5,1	18,5 ± 3,7	0,5 ± 0,5	11,0 ± 2,2	0,0 ± 0,0	63,9 ± 10,3
3t(Ch+D)	K	6,5 ± 1,7	27,1 ± 2,6	78,7 ± 5,0	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,6	8,4 ± 1,8	0,0 ± 0,0	122,4 ± 6,9
	0	5,2 ± 1,7	14,2 ± 3,2	43,7 ± 3,4	3,0 ± 2,3	0,8 ± 0,2	8,1 ± 0,9	0,0 ± 0,0	77,3 ± 10,7

Graf 15: Spektrum endogenních rozpustných sacharidů SE po kombinaci postmaturačního ošetření (D 97%RH +Ch) v závislosti na sacharidovém složení maturačního média.

SE= somatická embrya, Z= zrání, (D 97%RH+Ch) = desikační ošetření při 97% RH a chladové ošetření aplikované současně, K= kontrolní varianty- extirpovaná SE kultivovaná po 4 dny od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 3% sacharózu, S+R= extirpovaná SE kultivovaná po 4 dny od počátku 7.t zrání na TMM obsahujícím 1,5% sacharózu a 2,6% rafinózu.5H₂O.

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 15

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]					celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	myo-inositol	
před ošetřením	K	0,7 ± 0,5	1,9 ± 0,4	107,7 ± 6,0	4,9 ± 0,9	11,7 ± 1,2	126,9 ± 8,5
	S+R	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	150,1 ± 13,8	2,8 ± 0,7	16,1 ± 2,0	170,2 ± 16,2
3(D 97%RH+Ch)	K	44,4 ± 3,7	9,2 ± 1,8	33,5 ± 8,1	18,5 ± 2,8	3,4 ± 0,7	109,0 ± 10,1
	S+R	48,1 ± 1,5	17,2 ± 13,4	35,6 ± 3,9	16,1 ± 2,9	4,7 ± 1,0	121,7 ± 15,4

4.1.3. Klíčení somatických embryí

4.1.3.1. Třítýdenní klíčení SE na germinačním médiu standardního složení

Různá postmaturační ošetření se vedle kumulace RFO v SE také výrazně odrážela v následném vývoji klíčnicích rostlin. Třítýdenní klíčnicí rostliny byly řazeny do čtyř základních kvalitativních kategorií podle charakteru vývoje kořene, hypokotylu a apikálního meristému spolu s dělohami (viz kap. 3.7.).

Postmaturačně neošetřená SE byla handicapována zhoršeným vývojem kořene. Kořen často neprorůstal nebo silně kalusovatěl. Také pro hypokotyl byl u této varianty SE charakteristický často přítomný kalus. Třítýdenní chladové ošetření SE nevedlo ke zlepšení průběhu klíčení a u SE, která byla kultivována během chladového ošetření na TMM, často docházelo naopak ke zhoršení vývoje klíčnicích rostlin ve srovnání s rostlinami pocházejících z postmaturačně neošetřených SE. Pro postmaturačně neošetřená SE nebo SE ošetřená chladem byl typický vitrifikovaný vzhled.

Standardní ošetření pomalou desikací výrazným způsobem přiblížilo celkový habitus klíčnicích rostlin ke klíčnicím rostlinám ze ZE. Ve většině případů docházelo k prorůstání kořene a vývoji kořenového vlášení. Vitrifikace charakteristická pro postmaturačně neošetřená SE nebo SE ošetřená chladem zde téměř nebyla pozorována. Klíčnicí rostliny pocházející ze SE, která byla současně ošetřena pomalým desikačním a chladovým ošetřením, se téměř nelišily od klíčnicích rostlin vyvíjejících se ze SE ošetřených pomalou desikací.

Desikační ošetření SE v atmosféře s 97% relativní vzdušnou vlhkostí bylo pro značnou část SE kultury AFO 541 letální. Graf 16A prezentuje data pro klíčnicí rostliny této varianty z vybraných SE, která vykazovala nejmenší známky hnědnutí. SE klíčila úspěšněji při současné aplikaci tohoto typu desikačního ošetření a chladového ošetření (graf 16A). Kvalita klíčnicích rostlin byla ale přesto ve srovnání s klíčnicími rostlinami ošetřenými současně pomalým desikačním a chladovým ošetřením výrazně snížena.

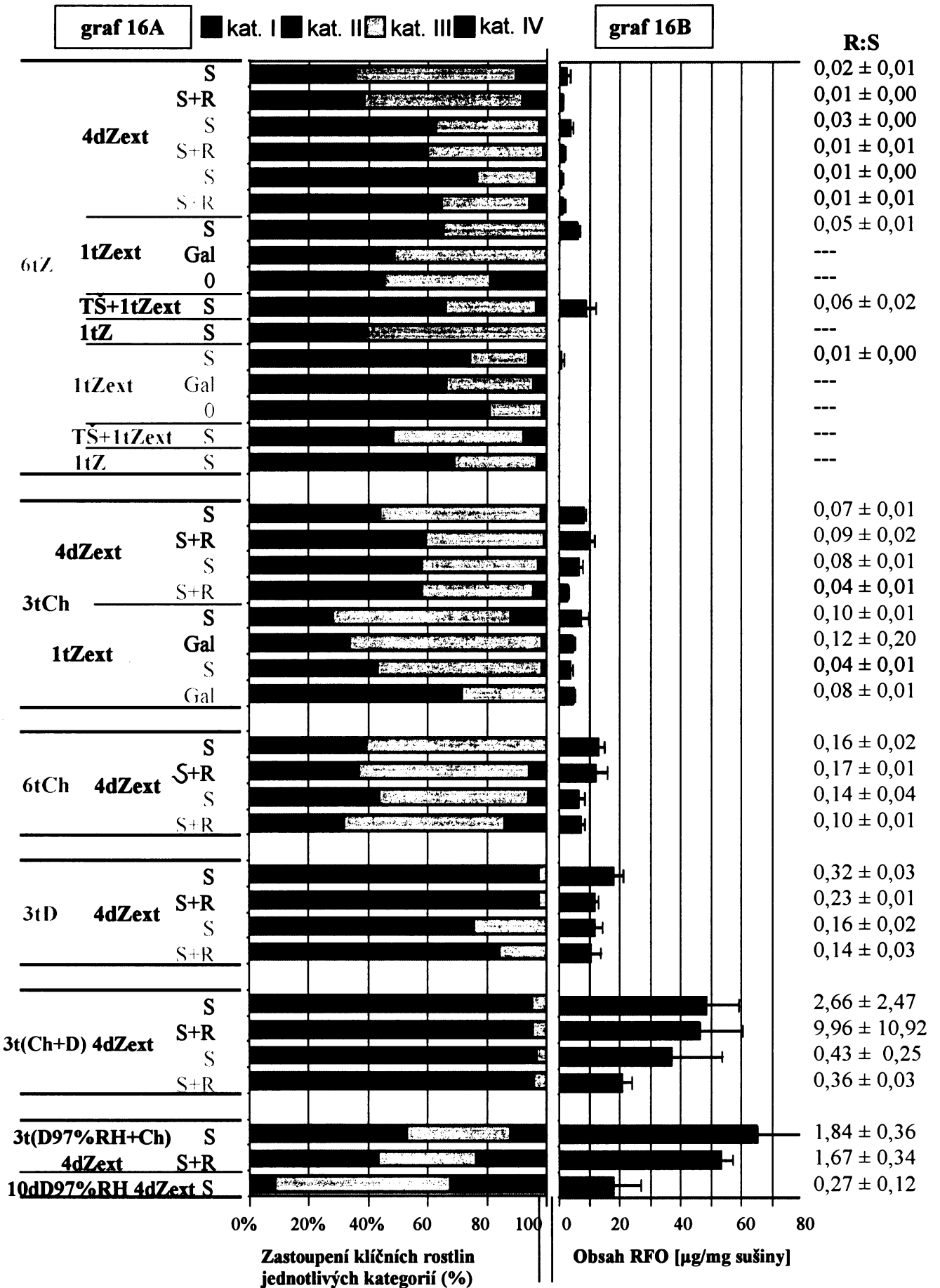
Graf 16B v kombinaci s grafem 16A a dále graf 17 prezentují, že v případě třítýdenního klíčení SE smrku ztepilého na standardním germinačním médiu obsahujícím 1% sacharózu nebyl shledán úzký vztah mezi kvalitou klíčnicích rostlin a výchozí hladinou RFO.

Graf 16A: Poměrné zastoupení klíčních rostlin jednotlivých kvalitativních kategorií vyvíjejících se ze SE v závislosti na druhu předchozích maturačních a postmaturačních ošetření- viz str. 68

Graf 16B: Hladiny RFO u SE před počátkem klíčení v závislosti na druhu předchozích maturačních a postmaturačních ošetření- viz str. 68

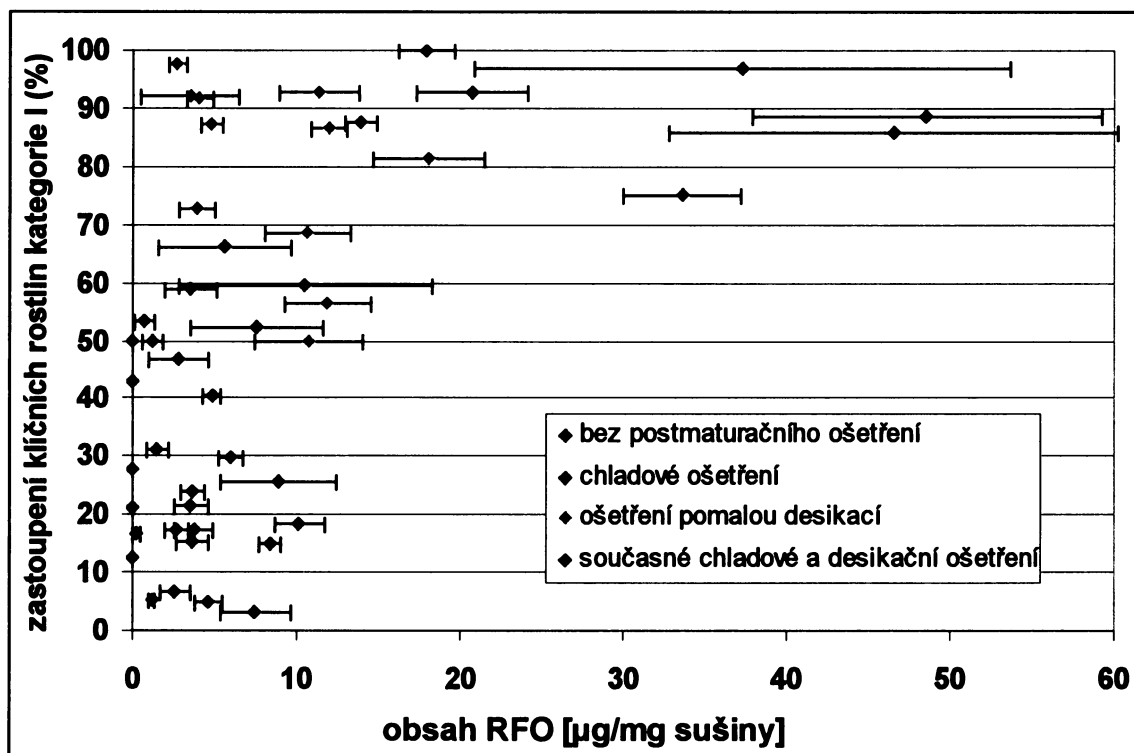
-hodnoceny byly třítydenní klíčící rostliny.

SE= somatická embrya, **RFO=** oligosacharidy rafinózoové řady, **kat.=** kategorie, **d=** den, **t=** týden, **Z=** zrání, **ext=** extirpovaná SE, **Ch=** chladové ošetření, **D=** standardní ošetření pomalou desikací, **(D+Ch)=** současné chladové a pomalé desikační ošetření, **TŠ=** tepelný šok, **D97%RH=** desikační ošetření za 97% relativní vzdušné vlhkosti, **(D97%RH+Ch)-** současné chladové a desikační ošetření za 97% relativní vzdušné vlhkosti, **R:S=** poměr hladin oligosacharidů rafinózoové řady a sacharózy (zeleně- R:S přesahující poměr označovaný za dostatečný pro ochranu buněčných ultrastruktur při desikaci ($\geq 0,05$ - podle Lin a Huang, 1994)), **SE** kultivovaná od počátku 7.t zrání na **TMM: obsahujícím 3% sacharózu (S)**, **neobsahujícím sacharid (0)**, **obsahující místo 3% sacharózy 1% galaktózu (Gal)**; šedivé popisky prezentují data z opakování jednotlivých pokusů.



Graf 17: Zastoupení zdárně se vyvíjejících klíčnicích rostlin (1. kategorie) ze SE v závislosti na výchozí endogenní hladině RFO.

-hodnoceny byly třítydenní klíčnicí rostliny v počtu 60-120 od každé varianty, n (pro stanovení endogenní hladiny RFO)= 5 až 6.



4.1.3.2. Aplikace DGJ- zpomalení katabolizmu RFO v raných fázích klíčení SE

V chladu desikovaná SE smrku ztepilého byla ihned po tomto třítydenním postmaturačním ošetření vystavena působení specifického inhibitoru kyselých a neutrálních α -galaktozidáz- 1-Deoxygalaktonojirimycinu (DGJ), a to za účelem inhibice nebo zpomalení rychlé degradace RFO u SE v raných fázích klíčení. Roztok inhibitoru byl aplikován po dobu dvou hodin před vysazením SE na germinační médium. U kontrolní varianty byla aplikována po dobu dvou hodin pouze destilovaná voda. Výchozí poměr hladiny RFO (graf 18,20, var. 0dG) a celkové hladiny rozpustných sacharidů po postmaturačním ošetření dosahoval u SE hodnot $27,42 \pm 2,57 \%$ a $48,9 \pm 3,81 \%$ při opakování pokusu.

Následovalo třítydenní klíčení SE, které se lišilo od standardního provedení. Inhibitorem ošetřená SE (var. DGJ), i neošetřená SE (kontrolní var.), byla nasazena na klíčení na germinační médium neobsahující sacharid. Další variantou byla inhibitorem ošetřená SE, která byla vysazena na germinační médium obsahující 1% galaktózu (varianta embryí značená DGJ Gal). Po prvních třech dnech klíčení byla SE všech variant přenesena na čerstvé germinační médium standardního složení.

U kontrolní varianty byla hladina RFO po 24h klíčení téměř nedetekovatelná (tabulka 18,20). U pokusných variant DGJ i DGJ Gal, došlo ke zpomalení katabolizmu RFO oproti kontrolní variantě. Zde byly RFO součástí endogenního spektra rozpustných sacharidů i po 72h klíčení (graf 18,20).

Během prvních 24 h klíčení došlo u kontrolní varianty k nárůstu hladiny myo-inositolu. Následný pokles hladiny sacharózy způsobil, že se myo-inositol stal po 72 h klíčení dominantním sacharidem spektra rozpustných sacharidů SE kontrolní varianty (graf 18,20). U varianty DGJ byl pozorován stejný trend, ale ve srovnání s kontrolní variantou byl průběh mírnější. U DGJ varianty byla vyšší celková hladina rozpustných sacharidů a také hladina glukózy. Kontrolní varianta i varianta DGJ se na rozdíl od varianty DGJ GAL kvalitativně i kvantitativně téměř nelišily u obou provedení pokusu (graf 18,20). U varianty DGJ Gal hladiny celkových rozpustných sacharidů během prvních 72h klíčení v případě druhého pokusu dokonce narůstaly a degradace RFO zde byla pomalejší ve srovnání s prvním pokusem. U obou pokusů zůstala sacharóza u varianty DGJ GAL během prvních 72 h klíčení majoritní složkou rozpustných sacharidů (graf 18,20). U všech variant byla hladina glukózy během prvních 72 h klíčení vyšší oproti hladině fruktózy, která byla často nedetekovatelná. Hladina galaktózy, produktu štěpení RFO, byla u pokusných variant vyjma varianty DGJ GAL velice nízká. Vyšší hladiny galaktózy stejně tak i fruktózy byly naměřeny po třech týdnech klíčení, a to u všech

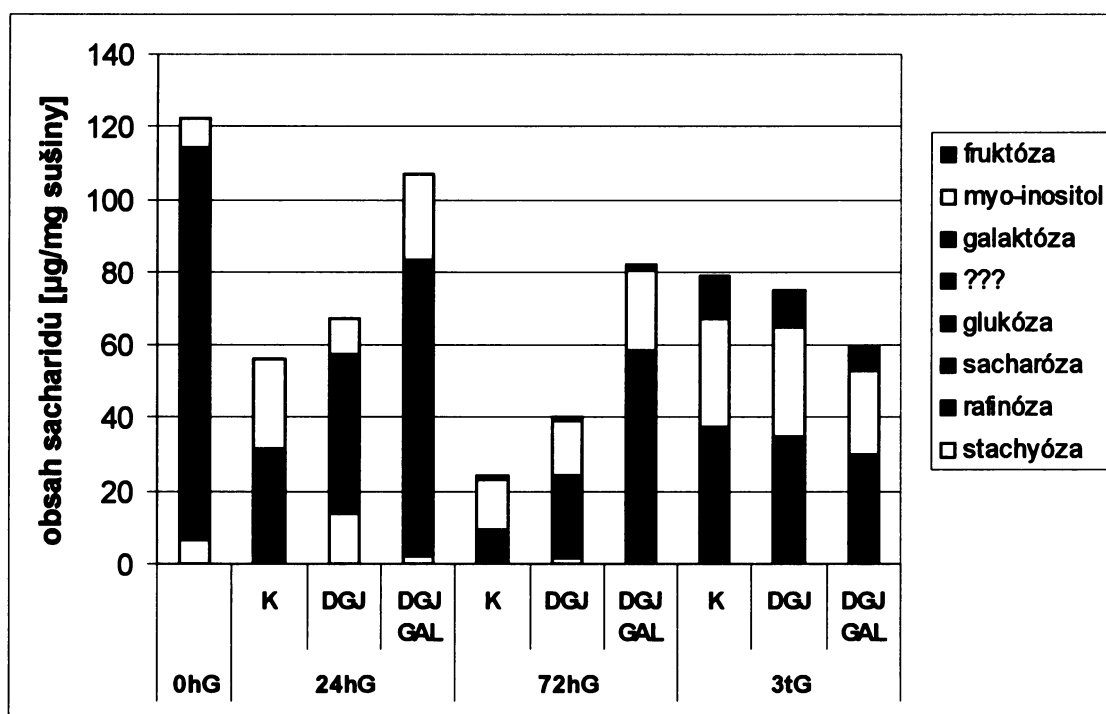
variant. Po třech týdnech klíčení byly hladiny rozpustných sacharidů všech pokusných variant z hlediska kvality i kvantity zastoupení v klíčících rostlinách vzájemně srovnatelné a srovnatelné i s variantou, která klíčila na germinačním médiu standardního složení po všech 21 dní klíčení (graf 18,20).

Obě provedení pokusu byla z hlediska spektra a hladin rozpustných sacharidů téměř identická. Naproti tomu čas, po kterém začala SE jednotlivých variant na germinačním médiu klíčit, byl odlišný a lišilo se i pořadí nástupu klíčení jednotlivých variant mezi oběma provedeními pokusu. Nástup klíčení nebyl u SE synchronní. Z tohoto důvodu byl měřen přírůstek jednotlivých SE v určitém časovém intervalu, který byl odstartován při zpozorování prodlužování prvních SE. V prvním provedení bylo možné vizuálně pozorovat nejčasnější nástup klíčení a nejrychlejší prodlužování hypokotylu SE u varianty DGJ GAL, a to po 40. h klíčení. Rozdíl v rychlosti prodlužování SE byl mezi variantami statisticky průkazný. U druhého provedení začala SE kontrolní varianty klíčit jako první, a to již po 24h klíčení. Data jsou znázorněna v grafech 19 a 21.

Graf 18: Vliv DGJ na obsah endogenních nestruturních sacharidů v průběhu klíčení SE.

DGJ- Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz; varianta K- DGJ neaplikován, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta DGJ- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta DGJ GAL- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu s 1% galaktózou; h- hodina, t- týden, G- klíčení.

-průměry \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.

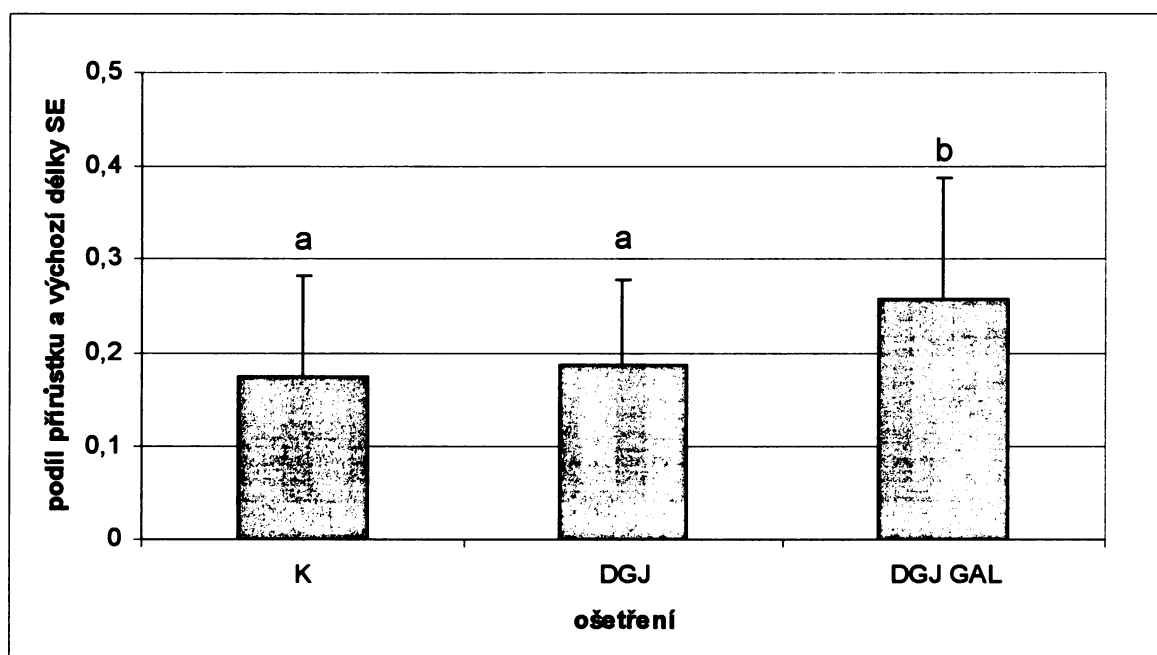


Tabulka dat ke grafu 18

obětí		Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	Galaktóza	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
0hG		6,5 ± 1,7	27,1 ± 2,6	78,7 ± 5,0	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,6	8,4 ± 1,8	0,0 ± 0,0	122,4 ± 6,9
	K	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	27,6 ± 6,5	1,3 ± 0,8	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,5	25,2 ± 4,9	0,0 ± 0,0	56,4 ± 8,2
24hG	DGJ	13,6 ± 3,3	3,9 ± 0,8	32,7 ± 7,3	6,7 ± 2,3	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1	9,9 ± 2,7	0,0 ± 0,0	67,2 ± 15,5
	DGJ GAL	2,2 ± 1,0	4,3 ± 1,4	59,5 ± 6,9	2,3 ± 0,8	0,0 ± 0,0	14,8 ± 2,4	24,2 ± 3,0	0,0 ± 0,0	107,2 ± 10,9
72hG	K	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,9 ± 1,6	2,4 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,4	13,4 ± 3,8	1,1 ± 0,4	24,2 ± 6,7
	DGJ	1,8 ± 0,7	2,3 ± 0,9	13,7 ± 2,3	3,9 ± 1,9	1,6 ± 0,8	1,1 ± 0,6	15,0 ± 3,7	1,1 ± 0,9	40,3 ± 9,0
	DGJ GAL	1,1 ± 0,4	2,2 ± 1,2	38,0 ± 7,9	3,4 ± 1,0	0,5 ± 0,7	13,3 ± 2,4	22,2 ± 2,3	1,2 ± 0,3	81,9 ± 7,7
3tG	K	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	21,7 ± 3,0	14,1 ± 3,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	29,9 ± 4,5	11,4 ± 2,7	78,6 ± 12,5
	DGJ	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	18,4 ± 3,5	13,3 ± 1,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,5	30,7 ± 3,8	9,9 ± 2,5	75,2 ± 11,4
	DGJ GAL	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	17,7 ± 2,5	10,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,4	23,5 ± 3,6	6,3 ± 0,6	59,4 ± 6,1

Graf 19: Vliv DGJ na nástup a rychlost prodlužování hypokotylu v raných fázích klíčení SE.

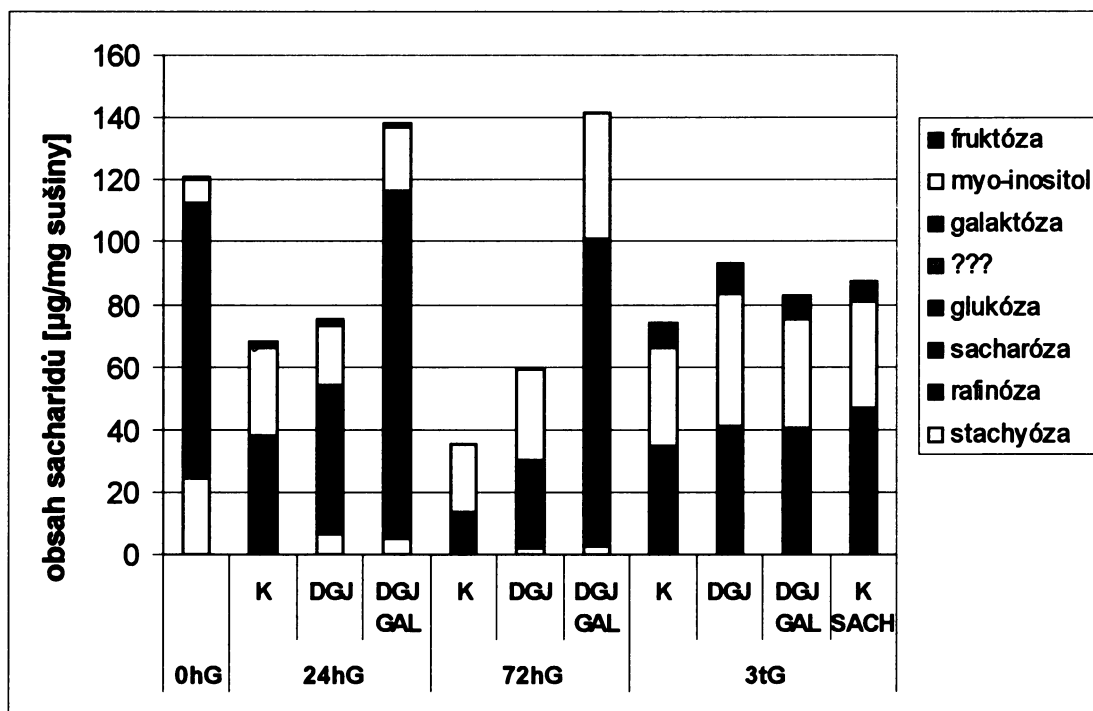
- vyjádřeno jako podíl přírůstku SE v časovém intervalu $40,7h \pm 2h$ až $70,5h \pm 2h$ od počátku imbibice a délky SE na počátku tohoto intervalu; **DGJ**- Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz; varianta **K**- DGJ neaplikován, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta **DGJ**- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta **DGJ GAL**- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu s 1% galaktózou, $n= 150 \pm 5$, odlišná písmenka (a,b,c) nad sloupci označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



Graf 20: Vliv DGJ na obsah endogenních nestrukturních sacharidů v průběhu klíčení SE, opakování.

DGJ- Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz; varianta K- DGJ neaplikován, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta DGJ- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid; varianta DGJ GAL- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu s 1% galaktózou; K SACH- DGJ neaplikován, klíčení po 21 dní na médiu s 1% sacharózou; h- hodina, t- týden, G- klíčení.

- průměry \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.

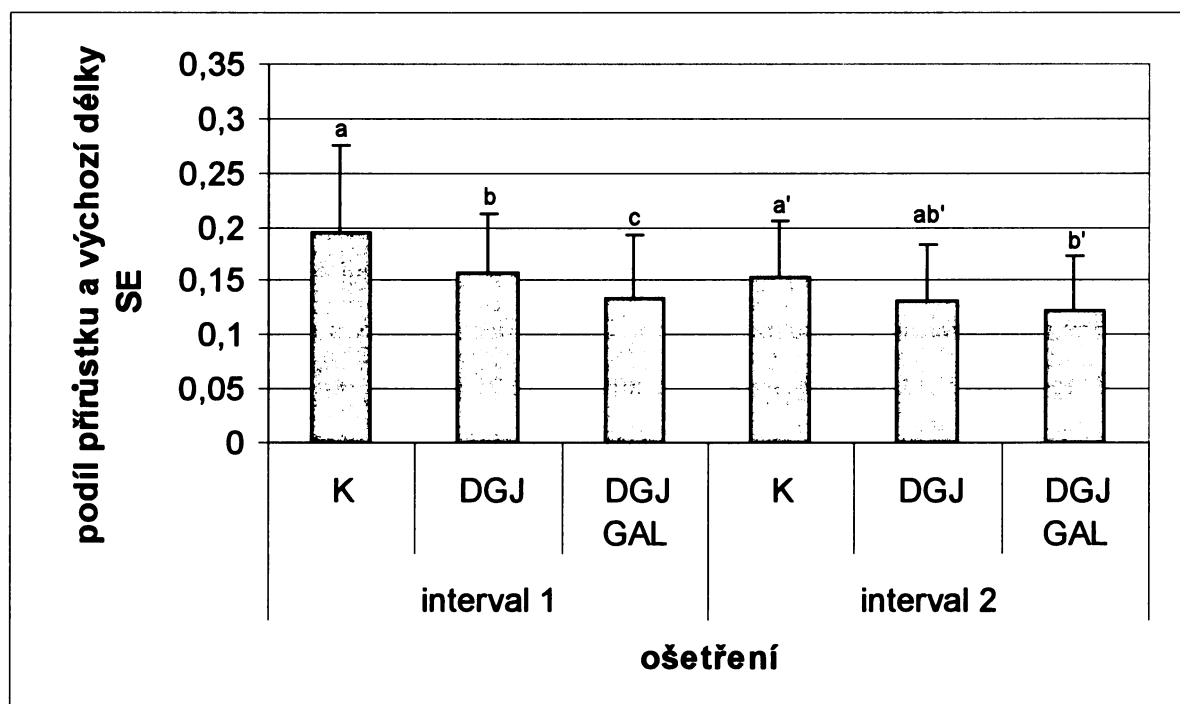


Tabulka dat ke grafu 20

ošetření		Obsah sacharidů [µg/mg sušiny]								celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	glukóza	???	galaktóza	myo-inositol	fruktóza	
0hG		24,1 \pm 3,8	34,0 \pm 4,7	45,4 \pm 12,9	7,3 \pm 4,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,3	7,4 \pm 0,8	0,9 \pm 0,5	120,9 \pm 16,1
24hG	K	0,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	34,0 \pm 5,8	1,7 \pm 0,5	0,2 \pm 0,4	1,4 \pm 0,9	27,9 \pm 4,6	2,1 \pm 0,4	68,0 \pm 11,5
	DGJ	6,7 \pm 1,1	7,3 \pm 1,0	34,5 \pm 3,5	4,4 \pm 0,9	0,2 \pm 0,5	0,9 \pm 0,1	19,4 \pm 2,0	1,9 \pm 0,2	75,4 \pm 5,3
	DGJ GAL	5,1 \pm 2,6	15,0 \pm 2,6	80,6 \pm 3,2	3,7 \pm 1,4	0,7 \pm 0,7	11,0 \pm 1,2	21,1 \pm 1,1	1,1 \pm 1,0	138,2 \pm 6,1
72hG	K	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	8,5 \pm 3,5	3,1 \pm 1,1	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,4	22,4 \pm 4,3	0,0 \pm 0,0	35,6 \pm 6,3
	DGJ	1,9 \pm 0,4	2,9 \pm 0,3	17,8 \pm 3,3	5,6 \pm 1,3	0,9 \pm 0,4	1,0 \pm 0,4	29,2 \pm 7,7	0,0 \pm 0,0	59,3 \pm 13,3
	DGJ GAL	2,7 \pm 1,4	4,8 \pm 1,9	67,9 \pm 5,3	3,8 \pm 0,5	2,4 \pm 0,8	19,4 \pm 1,7	40,5 \pm 3,5	0,0 \pm 0,0	141,5 \pm 9,9
3tG	K	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	20,7 \pm 4,4	11,8 \pm 5,4	0,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,9	31,6 \pm 7,8	7,8 \pm 3,2	73,9 \pm 20,3
	DGJ	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	26,5 \pm 6,3	11,7 \pm 2,4	0,0 \pm 0,0	2,8 \pm 0,9	42,6 \pm 6,6	9,3 \pm 2,9	92,9 \pm 14,6
	DGJ GAL	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,3	25,5 \pm 2,1	11,0 \pm 2,6	0,3 \pm 0,6	3,5 \pm 1,6	35,1 \pm 3,8	7,6 \pm 2,1	83,1 \pm 8,0
3tG	K SACH	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	30,2 \pm 6,7	10,8 \pm 3,3	0,0 \pm 0,0	5,7 \pm 1,6	34,0 \pm 7,1	6,7 \pm 2,4	87,4 \pm 19,8

Graf 21: Vliv DGJ na nástup a rychlost prodlužování hypokotylu v raných fázích klíčení SE, opakování

- vyjádřeno jako podíl přírůstku SE ve dvou následných časových intervalech a délky SE na počátku těchto intervalů: interval 1) $29,6\text{h} \pm 1,4\text{h}$ až $55,2 \pm 1,2\text{h}$, interval 2) $55,2\text{h} \pm 1,2\text{h}$ až $71,6\text{h} \pm 1,4\text{h}$; DGJ-Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz, varianta K- DGJ neaplikován, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid, varianta DGJ- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu neobsahujícím sacharid, varianta DGJ GAL- aplikace DGJ, prvních 72 hodin klíčení SE na médiu s 1% galaktózou, $n_{(\text{interval } 1)}=150 \pm 5$, $n_{(\text{interval } 2)}=75 \pm 5$, odlišná písmenka (a,b,c) nad sloupci označují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.



4.2. Klíčení semen smrku ztepilého

Po odstranění viditelně poškozených semen a semen plovoucích, která byla ve většině případů mrtvá, klíčilo 60 % semen.

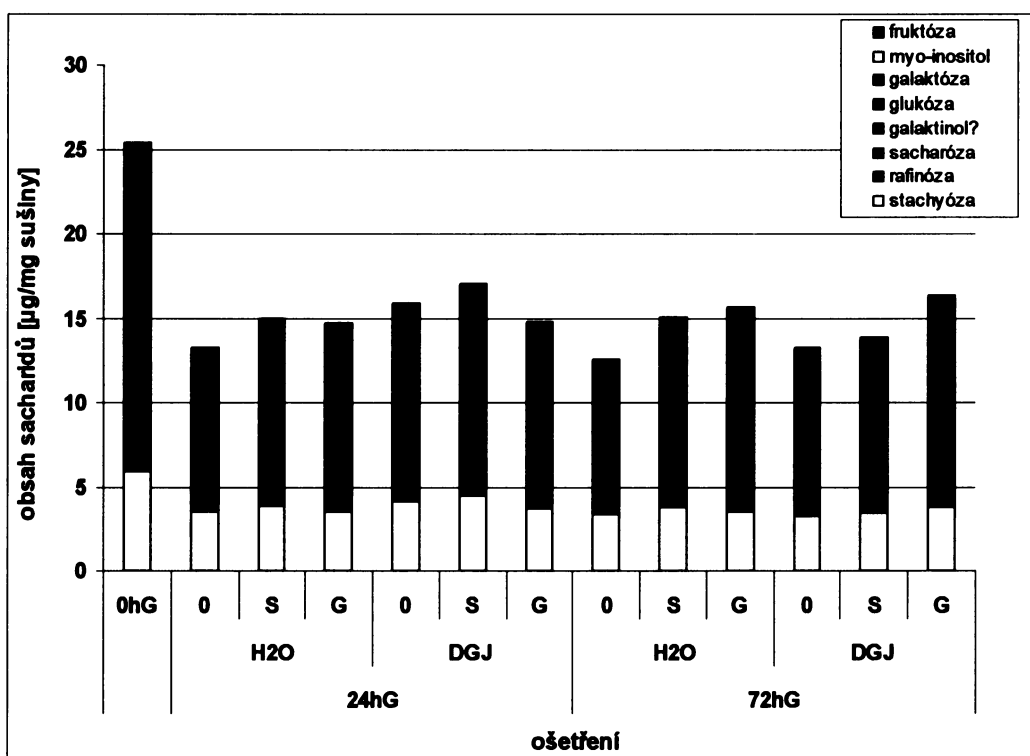
4.2.1. Aplikace DGJ- zpomalení katabolismu RFO v raných fázích klíčení semen

Pro testování důležitosti degradace RFO v raných fázích klíčení embryí smrku ztepilého byl inhibitor DGJ aplikován i během klíčení semen. Od semen smrku ztepilého byla očekávána vyšší synchronizace klíčení. I v tomto případě byl testován vliv 1% galaktózy a také 1% sacharózy. Klíčení semen bylo pozorováno po dobu pěti dní. Poté musel být pokus ukončen z důvodu rozšíření kontaminace, která byla u tohoto pokusu dříve či později předpokládána. Na rozdíl od kontaminace, k předpokládané degradaci RFO mezi 24. a 72. hodinou překvapivě nedocházelo. V časovém intervalu mezi 0-24. hodinou od počátku imbibice došlo k poklesu hladiny RFO, následně ale zůstaly hladiny RFO u všech pokusných variant víceméně na stejné hladině (graf 22). Po celou dobu pokusu si semena smrku ztepilého zachovala poměr rafinózy ku stachyóze blízky jedné.

Graf 22: Vliv DGJ na obsah endogenních nestrukturních sacharidů v průběhu klíčení semen.

DGJ- Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz; varianta H₂O- klíčení za přítomnosti destilované vody; varianta DGJ- klíčení za přítomnosti roztoku DGJ; varianta S- klíčení za přítomnosti 1% sacharózy; varianta G- klíčení za přítomnosti 1% galaktózy; varianta 0- klíčení bez dodaného sacharidu; h- hodina, G- klíčení.

- průměry \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6; do hmotnosti sušiny byla zahrnuta i hmotnost semenných obalů.



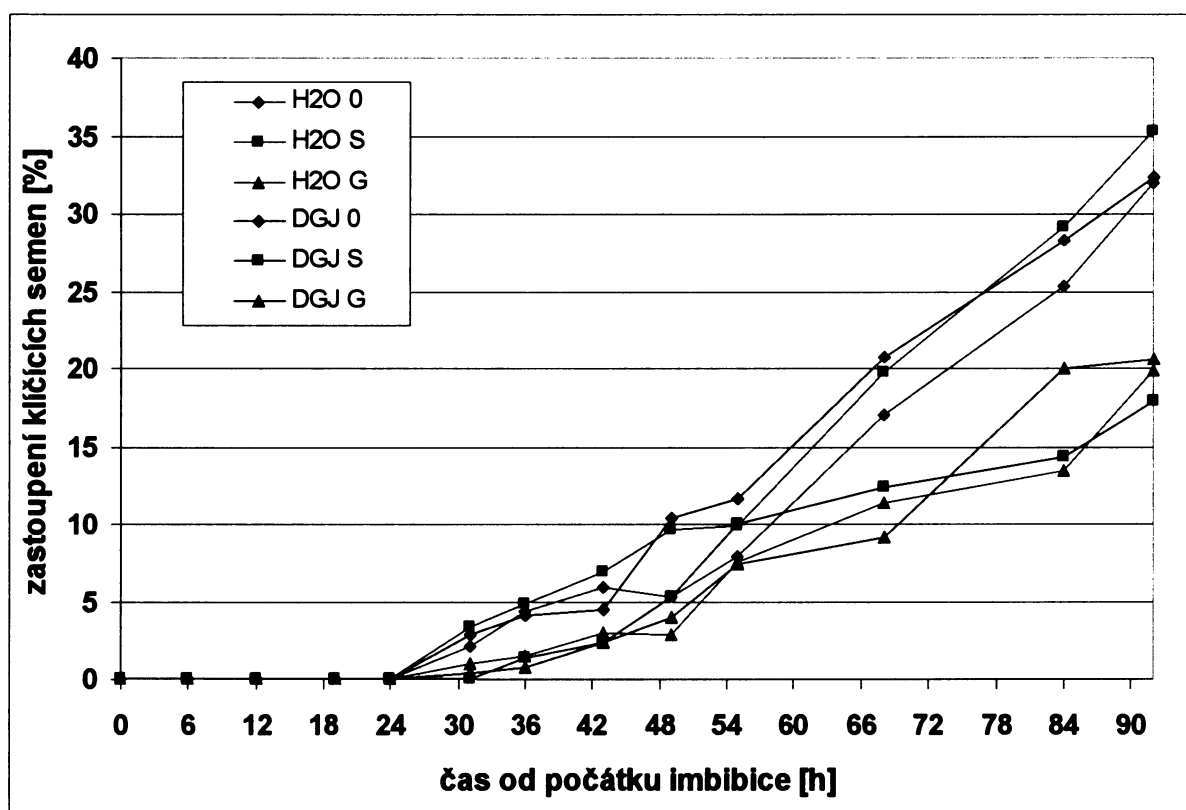
Tabulka dat ke grafu 22

ošetření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]										
		stachyóza	rafinóza	sacharóza	galaktinol ?	glukóza	galaktóza	myo- inositol	fruktóza	???	???	celk. obsah
0hG		5,9 ± 1,4	7,0 ± 1,4	11,4 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,9 ± 0,7	0,2 ± 0,1	27,5 ± 5,7
	H ₂ O	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,7	5,3 ± 1,5	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,4 ± 0,1	14,6 ± 3,0
24hG	H ₂ O	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,7	6,7 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	16,8 ± 1,4
	DGJ	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,3	6,5 ± 1,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	16,3 ± 1,6
	H ₂ O	4,1 ± 0,4	4,5 ± 0,4	6,5 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2	17,8 ± 1,1
	DGJ	4,4 ± 0,3	4,7 ± 0,8	6,6 ± 1,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2	0,7 ± 0,5	19,1 ± 2,4
	H ₂ O	3,6 ± 0,6	4,1 ± 0,8	5,8 ± 1,2	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2	16,4 ± 2,7
	DGJ	3,4 ± 0,6	3,2 ± 0,7	5,2 ± 1,7	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	14,3 ± 2,4
72hG	H ₂ O	3,8 ± 0,4	3,4 ± 0,7	7,1 ± 1,9	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	17,0 ± 1,9
	DGJ	3,5 ± 0,4	3,6 ± 0,6	6,9 ± 1,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	17,4 ± 2,0
	H ₂ O	3,3 ± 0,8	4,2 ± 1,0	5,0 ± 1,3	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	15,0 ± 3,5
	DGJ	3,4 ± 0,7	4,1 ± 0,9	5,4 ± 1,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2	15, ± 2,9
	H ₂ O	3,8 ± 0,4	4,7 ± 0,5	5,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	18,2 ± 1,6
	DGJ	3,8 ± 0,4	4,7 ± 0,5	5,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	18,2 ± 1,6

Graf 23: Vliv DGJ a druhu sacharidu na nástup klíčení u semen.

DGJ- Deoxygalaktonojirimycin= specifický inhibitor kyselých a neutrálních α -galaktozidáz; varianta H_2O 0- klíčení za přítomnosti pouze destilované vody; varianta H_2O S- klíčení za přítomnosti roztoku 1% sacharózy; H_2O G- klíčení za přítomnosti roztoku 1% galaktózy; varianta DGJ 0- klíčení za přítomnosti roztoku DGJ; varianta DGJ S- klíčení za přítomnosti roztoku DGJ a 1% sacharózy; DGJ G- klíčení za přítomnosti roztoku DGJ a 1% galaktózy; h- hodina.

-průměry \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 3, 100-120 semen / n.

**Tabulka dat ke grafu 23**

		zastoupení klíčících semen [%] v čase od počátku imbibice [h]								
odčítání		0 až 24 h	31 h	36 h	43 h	49 h	55 h	68 h	84 h	92 h
H_2O	0	0,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,3	4,3 \pm 1,0	5,9 \pm 0,3	5,3 \pm 1,4	7,9 \pm 1,4	17,0 \pm 3,6	25,3 \pm 3,2	32,0 \pm 0,8
	S	0,0 \pm 0,0	3,3 \pm 3,3	4,9 \pm 2,6	7,0 \pm 1,3	9,7 \pm 1,5	9,9 \pm 1,9	19,8 \pm 1,8	29,1 \pm 7,9	35,3 \pm 4,4
	G	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	1,5 \pm 1,5	2,9 \pm 2,9	2,9 \pm 2,1	7,5 \pm 2,3	11,4 \pm 3,6	13,4 \pm 2,6	19,8 \pm 1,8
DGJ	0	0,0 \pm 0,0	2,8 \pm 2,0	4,0 \pm 1,5	4,5 \pm 1,1	10,3 \pm 4,4	11,5 \pm 3,4	20,8 \pm 5,9	28,3 \pm 4,9	32,3 \pm 6,0
	S	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,3	2,3 \pm 0,3	5,3 \pm 1,2	10,0 \pm 2,1	12,3 \pm 2,6	14,3 \pm 3,2	17,8 \pm 2,9
	G	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2	3,9 \pm 0,5	7,4 \pm 0,9	9,2 \pm 0,5	20,0 \pm 2,6	20,7 \pm 3,6

4.3. Dynamika obsahu RFO v průběhu somatické embryogeneze jedle

(hybrid *Abies alba* x *A. numidica*)

Dřívější (nepublikované) výsledky našeho týmu naznačily, že v konečných fázích zrání SE jedle na pevném maturačním médiu obsahujícím 3% maltózu dochází u SE ke kumulaci RFO v nízkých hladinách. V této práci byl testován vliv dodaného druhu sacharidu do média na spektrum endogenních rozpustných sacharidů během zrání nejprve u celé ESM a posléze v utvářejících se SE. Zahrnuty jsou i fáze postmaturační. Vedle 3,16% maltózy zastoupené v maturačním médiu byl sledován i vliv 3% sacharózy v médiu na zrání embryogenní kultury jedle- AN 72.

Pro ESM jedle byl charakteristický pokles celkového obsahu endogenních rozpustných sacharidů po přenosu na PMM (graf 24A,24B,24C). Zásobení zrající kultury z média sacharózou nebo maltózou výrazně ovlivnilo celý proces zrání. Během prvních čtyř týdnů zrání na sacharóze byl u ESM zachován vysoký poměr hexóz ku sacharóze. Naproti tomu u ESM zrající na maltóze tvořily hexózy pouze minoritní složku spektra endogenních rozpustných sacharidů. Majoritní složkou zde byla maltóza spolu se sacharózou (graf 24A,24B,24C) (sacharózu od maltózy nebylo možné daným systémem HPLC oddělit). Na rozdíl od varianty pěstované na PMM S docházelo již v této fázi zrání u ESM na PMM M ke kumulaci rafinózy ve vysokých hladinách (graf 24A,24B,24C).

Po osmi týdnech zrání bylo spektrum endogenních rozpustných sacharidů u SE obou pokusných variant podobné. SE zrající na PMM M ale kumulovala RFO ve vyšších hladinách oproti SE zrajícím na PMM S (graf 24A,24B,24C). Tento rozdíl mezi SE pokusných variant zůstal zachován až do konce zrání kultury, které bylo ukončeno po devíti nebo deseti týdnech (viz. kap. 3.2.2.2). Podstatný rozdíl ve spektru endogenních rozpustných sacharidů mezi variantami byl pozorován také u zbytkové ESM po devíti týdnech zrání. Zbytková ESM varianty zrající na PMM S byla z hlediska spektra endogenních rozpustných sacharidů téměř identická se spektrem endogenních rozpustných sacharidů proliferující ESM. Naopak u zbytkové ESM varianty zrající na PMM M bylo spektrum endogenních rozpustných sacharidů podobné situaci u zralých SE (graf 24A,24B,24C).

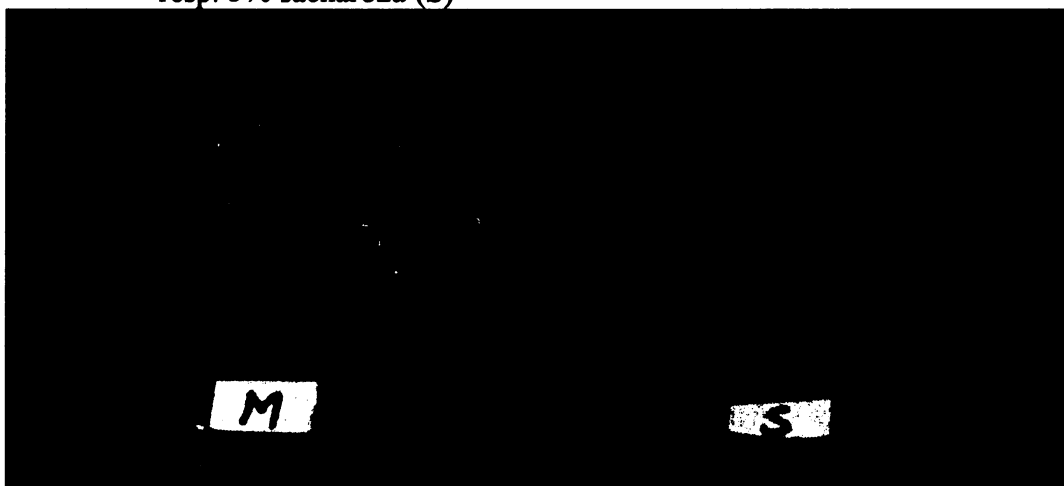
Sacharid dodaný do média také výrazně ovlivnil míru proliferace kultury po přenesení na maturační médium. Pro ESM zrající na PMM M byl charakteristický pomalý, ale stálý nárůst, který byl urychlen po přenosu kultury na dozrívací médium. V případě kultury zrající na

PMM S byl zpočátku prudký nárůst ESM vystřídán výrazným zpomalením růstu. Zbytková ESM ke konci zrání nezřídka hnědla (obrázek 2).

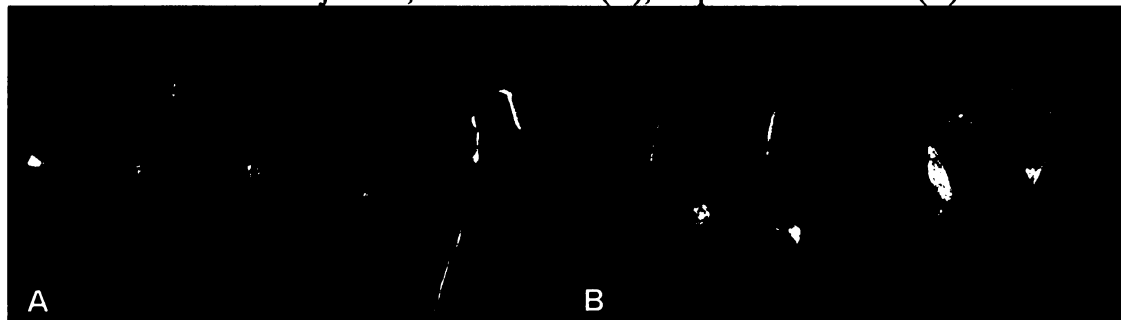
Zásobení zrajících SE sacharózou nebo maltózou se velmi významně promítlo do celkové efektivity zrání. Na jedné Petriho misce (\varnothing 9 cm) obsahující PMM M uzrálo 133 ± 74 SE, kdežto u PMM S pouze 3 ± 2 SE (obrázek 2). Z důvodu malé výtěžnosti SE především u varianty zrající na PMM S, chybějí v grafech některá data týkající se postmaturačních fází vývoje. Zralá SE z PMM M byla výrazně menší oproti SE z PMM S. V poměru k hypokotylu měla menší dělohy a často zůstal zachován suspensor. SE, která uzrála na PMM S vykazovala často zhoršený vývoj především kořenového pólu embryí.

V kontrastu k situaci pozorované během zrání SE, vedlo standardní čtrnáctidenní ošetření SE jedle pomalou desikací ke kumulaci RFO ve vyšších hladinách u SE pocházejících z PMM S oproti PMM M (graf 25). Třítýdenní klíčící rostliny jedle jsou znázorněny na obrázku 3.

Obrázek 2: SE jedle po devíti týdnech zrání na médiu obsahujícím 3,16% maltózu (M) resp. 3% sacharózu (S)



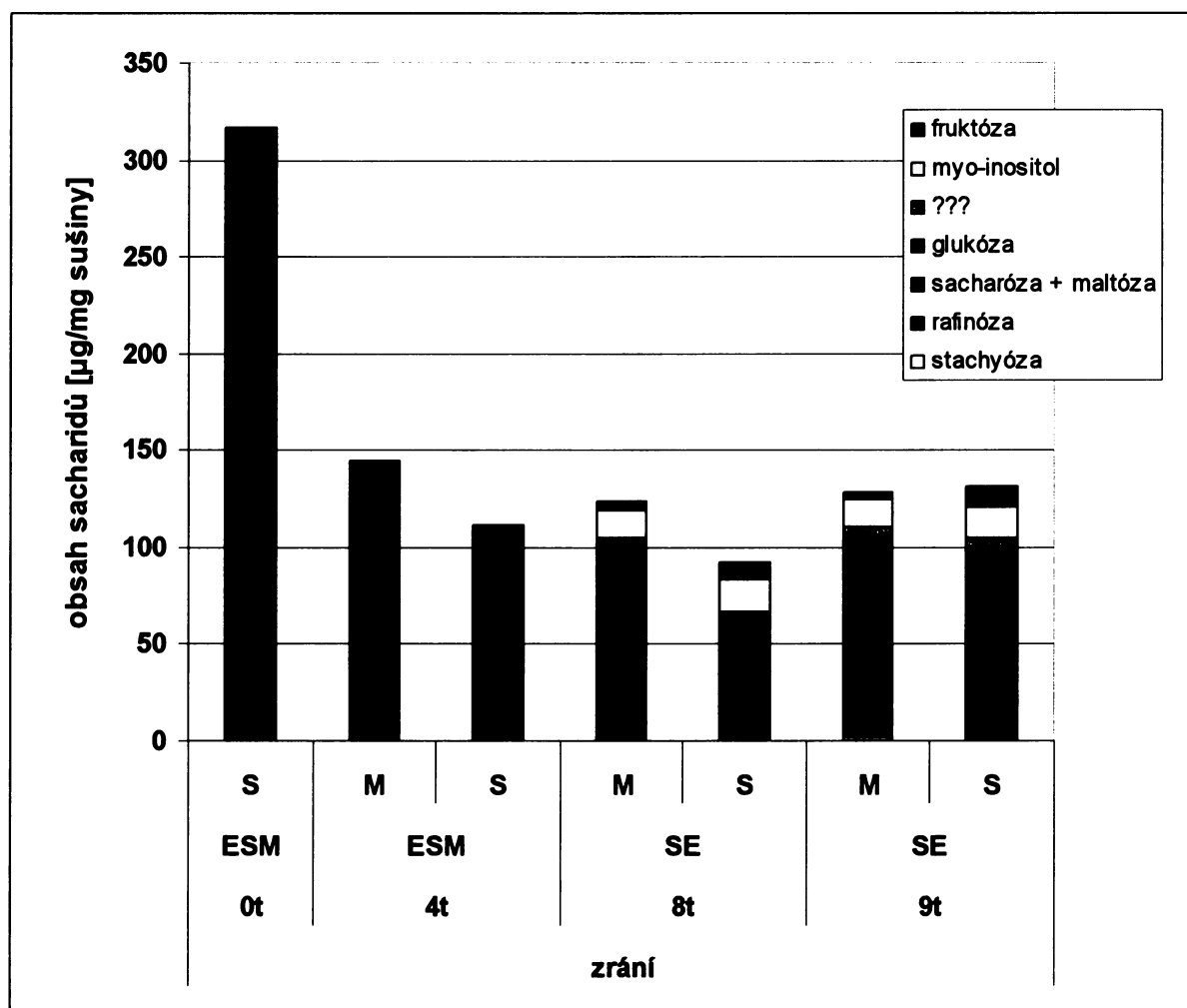
Obrázek 3: Třítýdenní klíčící rostliny jedle pěstované ze SE, která uzrála na maturačním médiu obsahujícím 3,16% maltózu (A), resp. 3% sacharózu (B).



Graf 24A: Vliv přítomnosti sacharózy resp. maltózy v médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů během zrání SE.

SE= somatická embrya, ESM= embryonálně-suspensorová hmota, t= týden, S= maturační médium obsahující 3% sacharózu, M= maturační médium obsahující 3,16% maltózu,

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



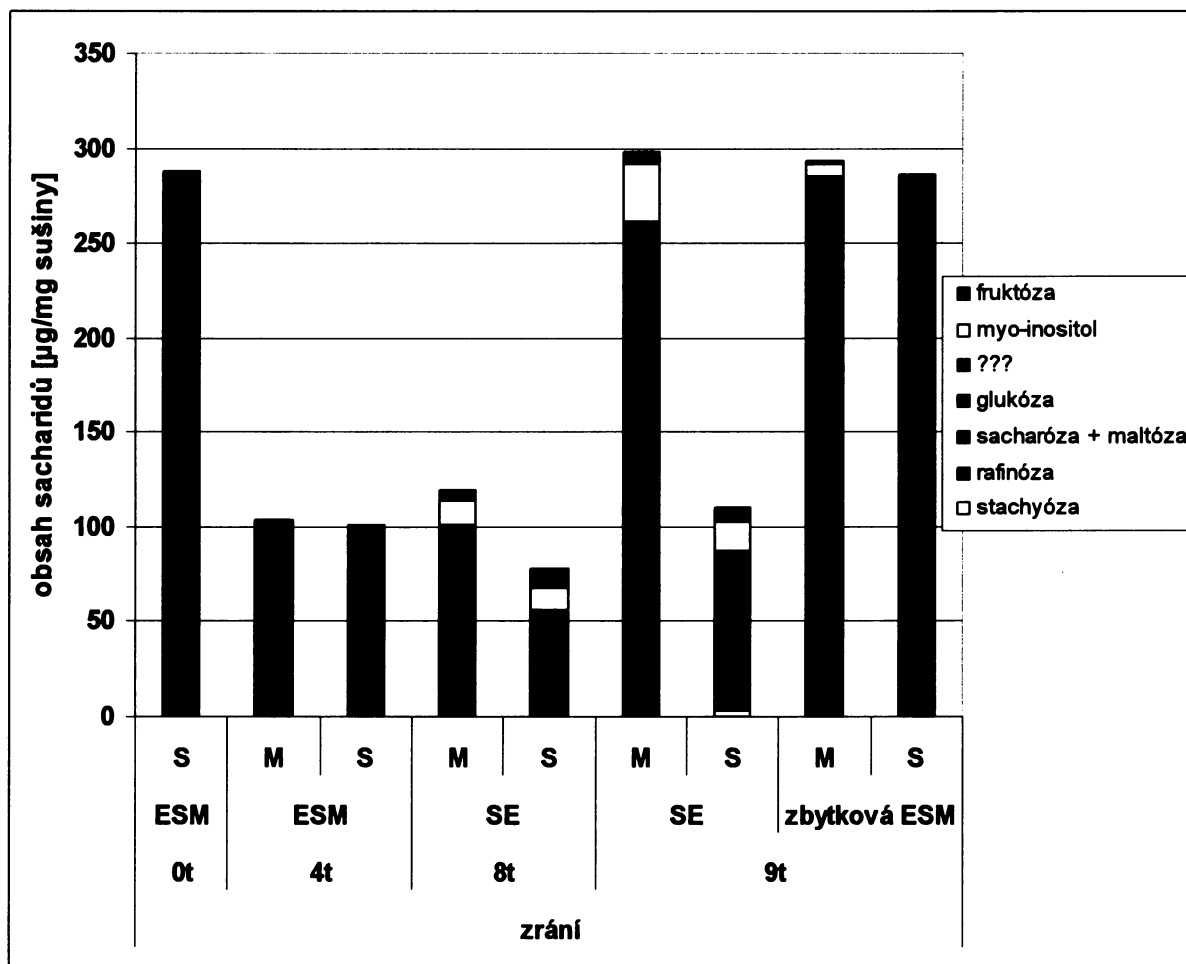
Tabulka dat ke grafu 24A

		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							
období	období	stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	???	myo-inositol	fruktóza	celk. obsah
0t	S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	20,5 ± 1,6	99,3 ± 9,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	196,8 ± 13,3	316,6 ± 21,5
	M	0,0 ± 0,0	33,9 ± 7,8	91,7 ± 13,5	10,0 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 2,1	144,7 ± 25,9
4t	S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	19,8 ± 8,7	30,3 ± 12,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	61,4 ± 23,6	11,5 ± 43,7
	M	0,0 ± 0,0	22,2 ± 1,7	65,6 ± 0,7	17,1 ± 2,0	0,0 ± 0,0	14,1 ± 2,7	4,9 ± 1,2	123,9 ± 16,6
8t	S	0,0 ± 0,0	7,2 ± 0,5	46,9 ± 4,0	12,0 ± 1,6	0,6 ± 1,2	17,2 ± 1,5	8,7 ± 1,6	92,5 ± 4,8
	M	2,1 ± 1,8	18,8 ± 3,1	68,9 ± 4,1	15,4 ± 2,0	5,5 ± 1,0	14,1 ± 1,4	3,7 ± 0,8	128,5 ± 5,2
9t	S	0,0 ± 0,0	7,8 ± 1,6	77,0 ± 4,3	13,4 ± 2,9	6,2 ± 1,5	16,1 ± 0,9	10,3 ± 2,2	130,8 ± 11,2

Graf 24B: Vliv přítomnosti sacharózy resp. maltózy v médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů během zrání SE, opakování.

SE= somatická embrya, ESM= embryonálně-suspensorová hmota, t= týden, S= maturační médium obsahující 3% sacharózu, M= maturační médium obsahující 3,16% maltózu,

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6



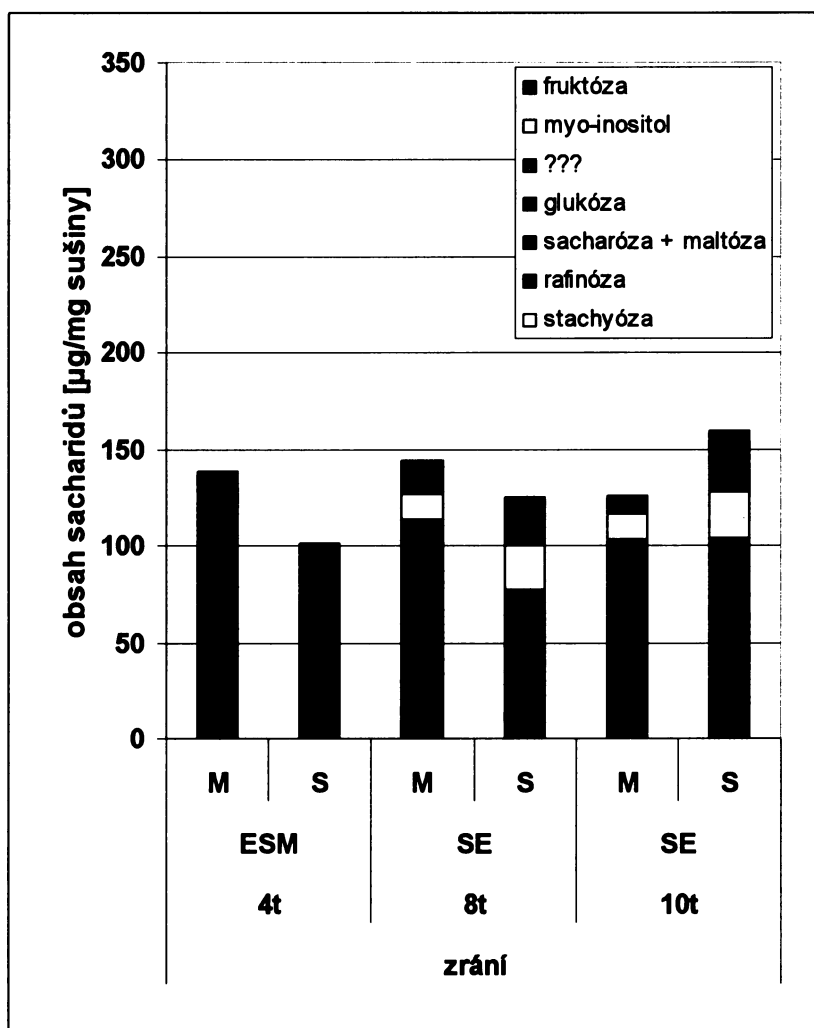
Tabulka dat ke grafu 24B

odpověď			obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							celk. obsah
			stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	???	myo-inositol	fruktóza	
0t	ESM	S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	29,3 ± 30,6	102,6 ± 29,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	155,7 ± 25,1	287,5 ± 70,3
		M	0,0 ± 0,0	12,5 ± 13,9	75,9 ± 32,4	7,9 ± 3,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,2 ± 3,3	103,4 ± 43,0
4t	ESM	S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	16,1 ± 6,3	28,4 ± 11,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	56,0 ± 24,7	107,7 ± 43,0
		M	0,0 ± 0,0	26,8 ± 8,5	60,3 ± 5,6	14,0 ± 1,9	0,0 ± 0,0	12,6 ± 1,9	5,8 ± 0,8	119,4 ± 13,7
8t	SE	S	0,0 ± 0,0	5,0 ± 0,6	44,5 ± 9,1	6,8 ± 4,5	0,0 ± 0,0	11,6 ± 5,4	9,7 ± 2,7	77,5 ± 18,0
		M	0,0 ± 0,0	41,8 ± 5,2	169,0 ± 21,2	34,8 ± 1,5	15,9 ± 4,3	29,5 ± 2,3	6,6 ± 1,9	297,7 ± 31,3
9t	zbytková ESM	S	2,4 ± 1,3	6,9 ± 1,1	60,7 ± 7,0	12,7 ± 2,5	4,1 ± 0,7	15,4 ± 1,8	8,0 ± 2,5	110,2 ± 10,2
		M	0,0 ± 0,0	55,7 ± 2,6	182,7 ± 25,1	45,0 ± 7,7	1,8 ± 3,6	6,1 ± 1,7	1,8 ± 1,4	293,2 ± 32,1
		S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	22,0 ± 7,2	118,5 ± 7,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	145,1 ± 5,7	285,6 ± 4,3

Graf 24C: Vliv přítomnosti sacharózy resp. maltózy v médiu na spektrum endogenních rozpustných sacharidů během zrání SE, opakování.

SE= somatická embrya, ESM= embryonálně-suspenzorová hmota, t= týden, S= maturační médium obsahující 3% sacharózu, M= maturační médium obsahující 3,16% maltózu,

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce, n = 5 až 6.



Tabulka dat ke grafu 24C

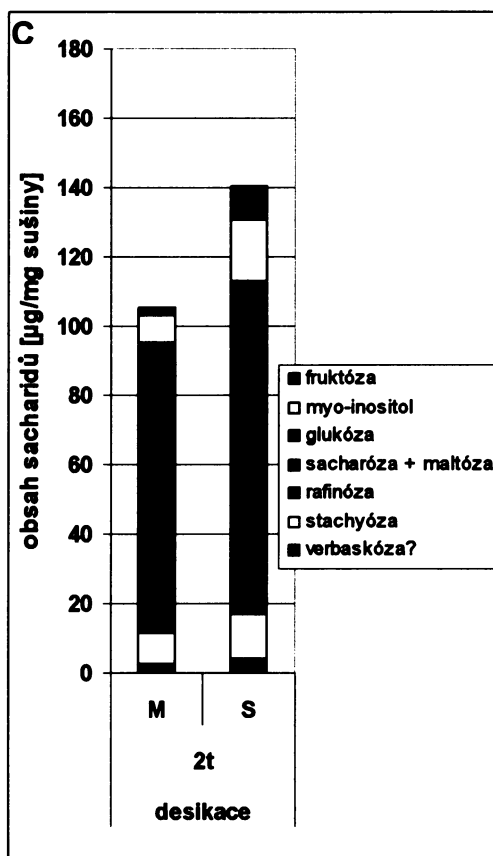
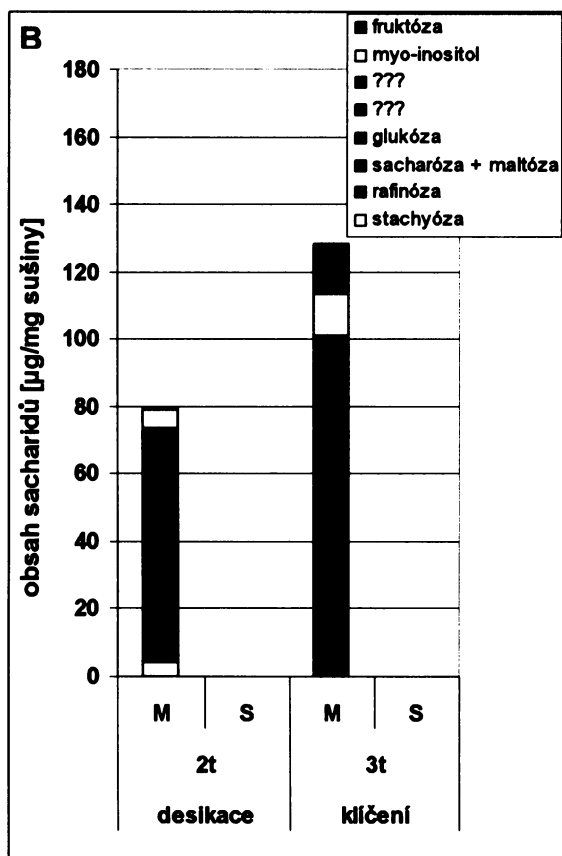
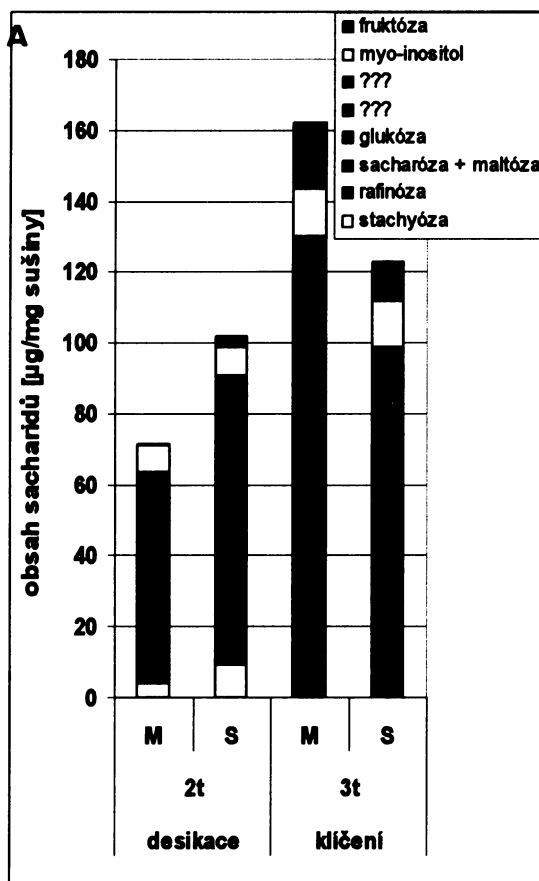
obětření		obsah sacharidů [µg/mg sušiny]							celk. obsah
		stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	???	myo-inositol	fruktóza	
4t	M	0,0 ± 0,0	37,8 ± 9,0	42,2 ± 10,7	27,3 ± 8,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	31,1 ± 9,5	138,4 ± 35,7
	S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,1 ± 4,1	24,6 ± 13,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	67,3 ± 27,4	101,0 ± 44,2
8t	M	0,0 ± 0,0	21,2 ± 1,8	70,2 ± 9,8	21,9 ± 2,4	0,0 ± 0,0	13,4 ± 2,1	17,3 ± 1,3	143,9 ± 16,3
	S	0,0 ± 0,0	9,5 ± 1,1	57,9 ± 12,6	6,7 ± 0,6	3,2 ± 1,8	23,1 ± 7,3	24,1 ± 10,1	124,5 ± 29,5
10t	M	0,0 ± 0,0	11,5 ± 1,8	68,5 ± 8,8	14,7 ± 2,2	9,2 ± 2,2	24,0 ± 3,9	30,9 ± 4,7	158,9 ± 17,2
	S	1,3 ± 2,9	17,1 ± 3,7	60,2 ± 16,7	16,3 ± 3,5	8,2 ± 2,4	13,4 ± 3,1	9,2 ± 2,8	125,8 ± 27,6

Graf 25: Vliv přítomnosti sacharózy resp. maltózy v médiu v průběhu zrání na spektrum endogenních rozpustných sacharidů v post-maturačních fázích vývoje SE.

- A, B, C prezentují výsledky jednotlivých opakování pokusu.

SE= somatická embrya, t= týden, S= maturační médium obsahující 3% sacharózu, M= maturační médium obsahující 3,16% maltózu,

-průměry ± směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulkách, n = 5 až 6



Tabulka dat ke grafu 25A

		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								
Ošetření		stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	???	???	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
dešička	2 M	3,9 ± 0,9	5,9 ± 1,0	35,5 ± 2,8	17,3 ± 2,7	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,5	7,9 ± 1,1	0,3 ± 0,5	71,5 ± 6,3
dešička	2 S	9,5 ± 1,9	13,7 ± 1,8	50,2 ± 2,7	15,0 ± 2,0	1,5 ± 1,9	0,5 ± 0,5	8,4 ± 2,3	3,0 ± 1,9	101,9 ± 5,7
dešička	3 M	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	90,3 ± 8,0	11,6 ± 2,1	23,3 ± 7,6	5,1 ± 1,1	13,4 ± 1,5	18,8 ± 4,5	162,3 ± 14,4
dešička	3 S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	72,7 ± 5,7	8,8 ± 3,6	12,1 ± 0,5	5,3 ± 0,5	12,9 ± 2,7	11,1 ± 2,4	122,8 ± 15,7

Tabulka dat ke grafu 25B

		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]								
Ošetření		stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	???	???	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
dešička	2 M	4,1 ± 1,3	19,2 ± 2,2	36,3 ± 4,7	13,2 ± 1,9	0,5 ± 1,0	0,0 ± 0,0	5,8 ± 1,2	0,5 ± 1,0	79,6 ± 9,2
dešička	2 S	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	63,1 ± 12,4	10,6 ± 3,5	22,5 ± 6,1	4,7 ± 1,6	12,6 ± 3,3	14,4 ± 2,9	127,9 ± 25,0

Tabulka dat ke grafu 25C

		obsah sacharidů [μg/mg sušiny]							
Ošetření		verbaskóza	stachyóza	rafinóza	sacharóza + maltóza	glukóza	myo- inositol	fruktóza	celk. obsah
dešička	2 M	2,8 ± 1,3	9 ± 4,5	14,2 ± 3,0	35,2 ± 8,5	34,0 ± 7,3	8,0 ± 2,1	2,4 ± 1,2	105,5 ± 22,1
dešička	2 S	4,1 ± 3,7	12,9 ± 1,3	18,0 ± 3,1	49,4 ± 12,0	28,3 ± 5,2	17,8 ± 2,9	9,6 ± 3,6	140,5 ± 20,5

5. DISKUZE

Oligosacharidy rafinosové řady (RFO) jsou v různé míře obsaženy v semenech téměř všech rostlinných druhů. V některých semenech se mohou na výsledné hmotnosti sušiny podílet více než patnácti procenty (Muzquiz et al., 1999). U konifer jsou RFO významnou součástí spekter endogenních rozpustných sacharidů semen (Pullman a Buchanan, 2008, citace tam). Z prací zabývajících se vývojem ortodoxních semen vyplývá, že metabolismus RFO je úzce spjat s vývojovým stádiem semene. Z dřívějších výsledků našeho týmu víme, že ke kumulaci RFO u ZE smrku ztepilého dochází po ukončení strukturálního vývoje embrya (Gösslová et al., 2001). Srovnání ZE a SE z hlediska dosaženého vývojového stádia embrya je značně obtížné. V současné době je za „zralé“ SE (zde ve smyslu plně připravené ke klíčení) považováno takové embryo, které je stavbou, spektrem endogenních rozpustných sacharidů i zásobních látek podobné zygotickému protějšku (viz kap. 2.3.). Carpenter et al. (2000) se domnívají, že pro „zralé“ SE jehličnanů je charakteristická právě přítomnost RFO. Předpokládá se, že RFO obecně u rostlin sehrávají vícero funkcí (viz kap. 2.5.). V případě jehličnanů nebyla úloha/y RFO doposud zkoumána. Pro studium s cílem alespoň částečně poodhalit význam přítomnosti RFO u SE jehličnů byla vybrána embryogenní linie smrku ztepilého AFO 541 pro její dlouhodobě neměnnou nízkou fenotypovou variabilitu a jako srovnávací linie byla použita embryogenní linie hybridu jedle (*Abies alba x nordmanniana*).

5.1. Somatická embryogeneze smrku ztepilého

V případě jehličnanů lze na základě určitých indicií v literatuře uvažovat, kromě ochranné, také o významné vyživovací funkci RFO v raných fázích klíčení semen (Downie a Bewley, 2000). Doposud publikované hladiny RFO u SE smrku ztepilého navozené desikačním nebo chladovým ošetřením přesahují hladiny naměřené u ZE. Vzhledem k absenci megagametofytu u SE, důležitého zásobního orgánu semen konifer, lze předpokládat, alespoň z tohoto pohledu, vyšší potřebné dosažené hladiny RFO u SE. U ZE byla prokázána daleko pomalejší a řízená rehydratace pletiv embrya zajištěná obklopujícím megagametofytem a dalšími krycími vrstvami semene až po semenné obaly v průběhu imbibice (Reid et al., 1999; Terskikh et al. 2005). Rychle probíhající rehydratace SE, tak zřejmě vede k většímu poškození buněčných struktur (Reid et al., 1999) a následné další vyšší spotřebě energie v období imbibice SE oproti ZE.

Prvotní snahou v této práci bylo získání zralých SE s kontrastními hladinami RFO. Nejjednodušším a ideálním způsobem získání SE s vysokou hladinou RFO se zdálo dodání RFO do maturačního média na konci zrání SE (maturační médium PMM S+R – obsah 1,5% sacharózy a ekvimolárního množství rafinózy). Výsledná SE by obsahovala RFO a zároveň nebyla postmaturačně ošetřena. To by umožnilo testování přímého vlivu RFO na SE. Ale v případě dodání rafinózy kultuře AFO 541 do PMM v šestém týdnu zrání docházelo ke štěpení dodané rafinózy. Místo rafinózy se v SE kumulovala melibióza (graf 1). Šestý (závěrečný) týden zrání SE byl vybrán z důvodu nedetekovatelné aktivity kyselých invertáz v SE v závěru zrání SE (Konrádová et al., 2002). Kyselé invertázy mohou kromě volné molekuly sacharózy štěpit také sacharózu vázanou v molekulách RFO (Sturm, 1999). Štěpení rafinózy kyselými invertázami dává vznik právě melibióze. Přítomnost melibiózy a naopak nedetekovatelná hladina rafinózy v SE vypovídají o zjevně stále dostatečně vysoké aktivitě kyselých invertáz v šestém týdnu zrání v rámci celé kultury AFO 541, která je zodpovědná za štěpení dodané rafinózy do PMM.

Domnívám se, že za štěpení dodané rafinózy byla zodpovědná svou metabolickou aktivitou především zbytková ESM. Tato část kultury si zachovává vysoký poměr hexóz vůči sacharóze na rozdíl od SE i v pozdních fázích zrání (Kubeš, 2004). Vysoký poměr hexóz k sacharóze je obecně spojován s aktivitami kyselých invertáz. Dodaná rafinóza do média tak vůbec nemusela přijít do kontaktu s vlastními SE. Jak ukázali Iraqi a Tremblay (2001a), Kubeš (2004), Iraqi et al. (2005) a Drážná (2006), je sacharóza v médiu při kultivaci embryogenních kultur smrku velice rychle štěpena vlivem aktivit extracelulárních enzymů. V závěru zrání SE tato aktivita klesá, ale i tak je většina sacharózy v médiu rozštěpena (Kubeš, 2004). Iraqi et al. (2005) zjistili, že toto štěpení je způsobeno právě aktivitou kyselých invertáz.

Z tohoto důvodu byla zavedena opatření, která měla co nejvíce zpřístupnit rafinózu zralým SE. Jednalo se o: posunutí kultivace SE na S+R maturačním médiu do počátku sedmého týdne zrání, zkrácení kultivace na čtyři dny, kultivována byla pouze extirpovaná SE a kultivace probíhala na TMM. Po zmíněných modifikacích uspořádání pokusu nebyla u SE melibióza detekována. Modifikace způsobily u SE kumulaci RFO sice v nízkých hladinách, ale RFO bylo přítomno ve všech odebraných vzorcích, překvapivě i ve vzorcích kontrolních (graf 2). Příčina kumulace RFO vyvolaná těmito ošetřeními zůstává neznámá. V případě TMM lze spekulovat o zvýhodněném přístupu SE ke složkám média, protože kultivace neextirpovaných SE na PMM v sedmém týdnu zrání ke kumulaci RFO nevedla (graf 2). Především lze uvažovat o zvýhodněném přístupu SE k sacharóze, jejíž endogenní hladina kultivací na standardním i S+R TMM narůstala, ale nelze vyloučit působení ostatních složek média, například kyseliny

abscisové (viz. kap. 2.4.3.). Zanedbatelný by nemusel být ani vliv samotné extirpace SE ve smyslu manipulace se SE, který mohl vyvolat stresovou reakci, či odloučení SE od zbytkové ESM (graf 5). Zbytková ESM by jednak mohla SE ovlivňovat nepřímo skrze změny složení média (viz. výše), anebo přímo. U některých buněk ESM v raných fázích zrání SE smrku ztepilého byla zjištěna exprese genu se signalizační funkcí megagametofytu (Wiweger et al., 2003). Zbytková ESM by tak mohla zastávat v somatické embryogenezi jehličnanů důležitější funkci, než jaká jí byla doposud přisuzována.

Ale zpět k rafinóze a k jejímu dodání do média SE smrku ztepilého v závěrečných fázích zrání. Doposud se neví, co určuje výslednou hladinu RFO v embryu, anebo v celém semeni. Je to rychlost syntézy, jak se domnívají Peterbauer et al. (2003), anebo rovnováha mezi protichůdnými procesy syntézy a degradace RFO (Keller a Pharr, 1996)? Z tohoto důvodu například neoznačují postmaturační ošetření za indukující syntézu RFO, ale za ošetření vedoucí ke kumulaci RFO. Jak už bylo řečeno, u obou, jak kontrolní, tak S+R varianty docházelo ke kumulaci RFO. U kontrolní varianty dokonce ve dvou případech ze tří byla vyšší hladina RFO ve srovnání s S+R variantou (graf 2). Domnívám se proto, že spíše než předpokládaným příjmem rafinózy z média, bylo výsledných hladin RFO u SE varianty S+R dosaženo syntézou.

Doposud není známo, jaké látky jsou ZE jehličnanů dodávány megagametofytem. Nejsou známy ani látky, které jsou transportovány z mateřské rostliny do celého semene. Smrk ztepilý (Lipavská et al., 2000; Konrádová et al., 2000), ale i jiné jehličnany (Hinesly et al., 1992) kumulují RFO v závislosti na ročním období. Teoretický transport RFO do zrajících semen je proto možný. Určitou bariéru transportu RFO do semen může představovat symplastické přerušování mezi pletivy semene a mateřské rostliny (Sasaki a Loewus, 1980). V tomto místě transportu by mohlo docházet k případnému štěpení RFO. RFO mohou být také syntetizovány megagametofytem a transportovány do ZE nebo i v rámci vlastních ZE syntetizovány *de novo*, případně se může jednat o různé kombinace zmíněného. Z tohoto důvodu nebyla experimentální varianta S+R zcela opuštěna a spektrum endogenních látek u ošetřených SE bylo studováno i v průběhu postmaturačních ošetření, které, jak se ukázalo, mohou být za určitého uspořádání silnými induktory kumulace RFO v SE smrku ztepilého. Ale i v případech postmaturačních ošetření varianty kultivované na TMM S+R je vzhledem k dosaženým hladinám RFO endogenní syntéza RFO u SE pravděpodobnější než příjem RFO z média (graf 7,8,10,13A,13B). Dodáním rafinózy do maturačního média v pozdních fázích zrání u SE k navýšení hladiny RFO v popsaném uspořádání kultivace nedochází.

Myo-inositol zaujímá v syntéze RFO ve srovnání s ostatními substráty výjimečnou úlohu. Je do sledu reakcí syntézy RFO zapojen, ale posléze opět uvolňován. Z tohoto důvodu je

myo-inositol někdy označován za kofaktor syntézy RFO (Tanner a Kandler, 1968). Myo-inositol není vlastní reakcí syntézy RFO spotřebováván. Některé práce ale naznačují, že jeho hladina může syntézu RFO do jisté míry limitovat (Karner et al., 2004).

Kultivace SE smrku ztepilého na TMM se zvýšenou koncentrací myo-inositolu (0,2%, 0,6% a 1%) vedla k navýšení endogenních hladin myo-inositolu u SE. V případě prvního provedení pokusu rostly endogenní hladiny myo-inositolu SE s narůstající koncentrací myo-inositolu v médiu v porovnání s kontrolní variantou 1,6x, 2,3x a 6x versus 1,4x, 1,8x a 2,5x u opakování pokusu (graf 4). V případě semen hrachu vedla dvoudenní inkubace semen s 0,9% myo-inositolem k trojnásobnému nárůstu endogenní hladiny myo-inositolu a nárůstu hladiny galaktinolu (galaktinol v syntéze RFO viz. kap.2.4.3.1.) (Karner et al., 2004).

Prezentované výsledky ukazují (graf 6 a 9) že kultivace SE smrku ztepilého na TMM s různými koncentracemi myo-inositolu v šestém týdnu zrání ovlivňují kumulaci RFO u SE během postmaturačních ošetření. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky ve výše zmiňované práci (Karner et al., 2004), kde byl pozorován těsný vztah mezi hladinami myo-inositolu a hladinami RFO u semen sedmi genotypů hrachu s rozdílnými endogenními hladinami myo-inositolu. Na rozdíl od výsledných hladin RFO u SE smrku ztepilého prezentovaných v této práci, zůstala v případě dvoudenní kultivace semen hrachu s 0,9% myo-inositolem hladina RFO nezměněná. Nezměněnou hladinu RFO si Karner et al. (2004) vysvětlují také nedostatečnou délkou kultivace pro syntézu RFO. Koncentrační škála myo-inositolu v TMM v této práci byla zvolena vhodně, protože se hladina RFO u SE mezi pokusnými variantami měnila a bylo možné pozorovat nárůst i pokles hladiny RFO v závislosti na rostoucích endogenních hladinách myo-inositolu u SE po jednotlivých postmaturačních ošetřeních.

Standardním ošetřením SE pomalou desikací bylo dosaženo nejvyšší hladiny RFO u varianty kultivované na TMM obsahující 0,2% myo-inositol, čili s hladinou dvojnásobně vyšší, nežli byla v somatické embryogenezi smrku v naší laboratoři doposud používána. U této varianty byla hladina RFO po třítýdenním ošetření 3,5x a v případě opakování pokusu 1,8x vyšší oproti hladinám u SE kontrolních variant. Hladiny RFO ostatních variant byly srovnatelné mezi sebou až na variantu kultivovanou na TMM obsahující 0,6% myo-inositol v rámci prvního provedení pokusu, kde byla hladina 1,6x vyšší oproti kontrolní variantě (graf 6).

Nižší hladiny RFO u SE z variant s vyššími endogenními hladinami myo-inositolu je možné vysvětlit podporou zpětných reakcí syntézy RFO vlivem vysoké koncentrace myo-inositolu. Takto si vysvětlují Gomes et al. (2005) nezměněnou nebo sníženou hladinu RFO v dělohách sóji, ve kterých byla kultivací zdvojnásobena hladina myo-inositolu ve srovnání s kontrolní variantou, nebo také Karner et al. (2004) nezměněnou hladinu RFO po dvoudenní

kultivaci semen hrachu s 0,9% myo-inoelem vedle již zmíněného předpokladu nedostatečné délky kultivace umožňující syntézu RFO.

Nárůst a pokles hladin RFO s narůstajícími endogenními hladinami myo-inoitolu u SE smrku ztepilého byl také pozorován po třítydenním chladovém ošetření. Zde byly ale naměřeny velmi variabilní hodnoty hladin RFO mezi jednotlivými odběry, což mělo za následek příliš vysoké směrodatné odchyly (graf 9). To mohlo být způsobeno vlastním charakterem uspořádání chladového ošetření, při kterém je kultura během ošetření stále kultivována na médiích, na kterých zrála již v průběhu šestého týdne zrání.

Zvyšující se osmotický potenciál médií s rostoucí koncentrací myo-inoitolu mezi jednotlivými pokusnými variantami nebyl v této práci kompenzován dodáním příslušného osmotika do médií s nižšími hladinami myo-inoitolu. Srovnatelný obsah vody u ošetřených SE po šestém týdnu zrání naznačuje, že příjem myo-inoitolu byl velice rychlý, a působení rozdílného osmotického potenciálu média pravděpodobně jen krátkodobé. Také výsledné spektrum endogenních rozpustných sacharidů SE nesignalizovalo působení osmotického stresu SE. Z předchozích výsledků našeho týmu víme, že působení osmotika během zrání mění poměry hladin hexóz vůči sacharóze, ke kterým zde nedocházelo (Lipavská et al., 2000a).

Kultivace SE smrku ztepilého na standardním maturačním médiu obsahujícím 0,1% myo-inoitol v šestém týdnu zrání zřejmě limituje konečnou hladinu RFO po postmaturačním ošetření vlivem nízké endogenní hladiny myo-inoitolu. Optimální, alespoň z hlediska nejvyšší kumulace RFO, se ukázala kultivace SE v šestém týdnu zrání na maturačním (TMM) médiu obsahujícím myo-inoitol v koncentračním rozmezí 0,2 až 0,6%.

V dalších pokusech bylo testováno, zda není syntéza RFO během postmaturačních ošetření limitována ještě ve dřívějším kroku syntézy- v syntéze UDP-galaktózy. vlivem omezené dostupnosti galaktózy v SE. Týdenní kultivace extirpovaných SE v sedmém týdnu zrání na TMM Gal vedla k mírnému nárůstu endogenní hladiny galaktózy (graf 3). Výsledná data ale regulaci hladiny RFO vlivem změn endogenních hladin galaktózy v SE nepodpořila (graf 7,11,13A,13B). Pokud je mi známo, neexistují žádná literární data o vlivu změn obsahu galaktózy, ať pozitivním nebo negativním, na syntézu RFO. Nicméně působení galaktózy na různé rostlinné kultury může být odlišné v závislosti na metabolismu galaktózy dané kultury. Například u suspenzních kultur *Vigna angularis* (Kato et al., 2007) způsobila dodaná galaktóza do média výrazné snížení endogenních hladin sacharózy i přes přítomnost sacharózy v médiu. Zde je ale nutno mít na paměti, že na rozdíl od suspenzních kultur představují zralá SE metabolicky výrazně pasivnější struktury. Ve srovnání s variantou kultivovanou na TMM 0 (tekuté maturační médium neobsahující sacharid) musela být galaktóza SE v průběhu kultivace

na TMM Gal metabolizována, protože hladina endogenní sacharózy po kultivaci byla srovnatelná, na rozdíl od varianty SE na TMM0, s hladinou sacharózy u SE po šestém týdnu zrání (graf 3).

Bylo prokázáno, že RFO jsou v rostlinách kumulovány v reakci i na jiné stresory nežli desikační nebo chladový. Z tohoto důvodu bylo testováno působení dalších stresorů na kumulaci RFO u SE smrku ztepilého. U listů *Arabidopsis thaliana* ošetřených tepelným šokem byla navýšena hladina rafinózy ve srovnání s listy rostliny neošetřené, a to vlivem posílení exprese genu galaktinolsyntázy 1 (více viz. kap. 2.4.3.1; Panikulangara et al., 2004). V případě SE smrku ztepilého se ukázalo, že je navození/posílení kumulace RFO u zralých SE v zásadě možné, jak ukazuje aplikace tepelného šoku na zralá SE v prvním provedení pokusu. U druhého provedení pokusu způsobilo tepelné ošetření SE namísto kumulace RFO „pouze“ výrazný nárůst hladiny sacharózy pozorovaný i v případě prvního provedení pokusu (graf 12). Jak již bylo zmíněno, kultivace SE na TMM v sedmém týdnu zrání (graf 2) vedla k indukci syntézy RFO, případně potlačila degradaci RFO, což způsobilo zmíněný nárůst hladiny RFO. Tepelný šok v druhém opakování ale tuto kumulaci RFO v SE potlačil (graf 12). Lze jen těžko spekulovat o příčině této reakce SE. U obou provedení pokusu je zřejmé, že hodinové 38°C ošetření vyvolalo u SE smrku ztepilého během následné týdenní kultivace na TMM změny na úrovni metabolismu endogenních rozpustných sacharidů, a to především sacharózy.

Extirpovaná SE smrku ztepilého, kterým nebyl dodán sacharid do TMM v průběhu sedmého týdne zrání, reagovala na toto ošetření výraznou redukcí hladiny sacharózy a hexóz a nekumulovala RFO (graf 3). Lze proto předpokládat, že toto ošetření vyvolalo u SE snížení dostupnosti hexóz a možná i určitou míru strádání po sacharidech, a tedy určité znevýhodnění při postmaturačních ošetření z hlediska syntézy RFO. Ale jak dokládají předběžné výsledky, docházelo během postmaturačních ošetření SE této varianty k nárůstu hladiny endogenních rozpustných sacharidů a dále ke kumulaci RFO v relativně vysokých hladinách, srovnáme-li tyto hladiny s hladinami u kontrolních variant (graf 14). Tyto změny sacharidového spektra do jisté míry vypovídají o důležitosti zastoupení i výši hladin jednotlivých endogenních rozpustných sacharidů (především RFO) u postmaturačně ošetřovaných SE. Na druhou stranu ale naznačují i určitou nezávislost na hladinách endogenních rozpustných sacharidů SE před vstupem do postmaturačních ošetření. Otázkou zůstává, jak zmíněné ošetření zasáhlo SE z hlediska metabolismu uložených zásobních látek.

Semena smrku ztepilého jsou během svého vývoje a následného období před počátkem klíčení vystavena desikaci, chladu i mrazu. Z tohoto důvodu bylo testováno, zda by jednotlivé stresové faktory paralelně nepřispěly k výsledné hladině RFO u SE smrku ztepilého.

Současné chladové a pomalé desikační ošetření/desikační ošetření za 97% relativní vzdušné vlhkosti u SE smrku ztepilého vedlo ke kumulaci RFO v nejvyšších naměřených hladinách ve srovnání s jednotlivými postmaturačními ošetřeními (graf 13A,13B,14,15). Byla-li aplikována dvě postmaturační ošetření postupně, ve sledu- tři týdny chladového a následně tři týdny pomalého desikačního ošetření, nedosahovala SE stejně vysokých hladin RFO, jako v případě současného působení zmíněných ošetření (graf 13B). Lze se proto domnívat, že konečná hladina RFO postmaturačně ošetřených SE smrku ztepilého je dána aktuální intenzitou stresových faktorů, která na SE působí.

SE smrku ztepilého linie AFO 541 prokázala vysokou senzitivitu k vyšší rychlosti poklesu obsahu vody ve svých pletivech, než ke kterému dochází při standardním ošetření pomalou desikací. Desetidenní desikační ošetření v atmosféře s 97% relativní vzdušnou vlhkostí (RH) vedlo k poklesu obsahu vody v SE na hodnotu blízkou 25 % z jejich čerstvé hmotnosti. SE jehličnanů úspěšně přežívají desikační ošetření i při výrazně nižších relativních vzdušných vlhkostech. Například SE smrku ztepilého přečkala tři dny při 97% RH, dále tři dny při 81% RH, následně týden při 63% RH a nakonec týden při 31% RH (Gorbatenko a Hakman, 2001). Ale jak zmiňuje Bomal et al. (2002), je pro ustavení tolerance k rychlé desikaci důležitá perioda pomalého snižování obsahu vody v SE. V případě SE *Picea mariana* se jednalo o první dva dny desikace v 97% RH. V případě *Picea mariana* (Bomal et al., 2002) i v případě SE smrku ztepilého (Gorbatenko a Hakman, 2001) byla SE vystavena prostředí s různými RH nepřímo, protože byla ještě uzavřena v Petriho miskách, které byly poté vloženy do prostředí s danou konstantní atmosférou. Díky odlišnému uspořádání pokusů, lze tedy předpokládat různou rychlost ustavení experimentální RH v bezprostřední blízkosti embryí, a tedy i odlišnou míru/možnost navození tolerance k rychlé desikaci.

Prezentované výsledky dokládají, že se v konečné hladině RFO u zralých SE smrku ztepilého kultury AFO 541 výrazně odráží působení vlivů vnějšího prostředí. Doposud byl publikován omezený počet prací zabývajících se kumulací RFO v semenech jehličnanů (Pullman a Buchanan, 2008- citace tam). Nikdo z autorů se nezabýval srovnáním, zda jsou hladiny RFO u semen jehličnanů mezi jednotlivými sezónami stálé, nebo zda se dramaticky mění, například po vzoru hladin zásobních lipidů u ZE *Picea abies* (Grigová et al. 2007). Kvantitativní srovnání zastoupení RFO v semenech smrku ztepilého v této práci s výsledky Gösslové et al. (2001) není možné, protože v sušině vzorků v prezentované práci byla zahrnuta i hmotnost semenných obalů. Kvalitativní srovnání ale možné je. V obou případech bylo zastoupení rafinózy ku stachyóze blízké jedné (graf 22). Toto pozorování je v souladu s Lin a Huang (1994), kteří se domnívají, že poměr rafinózy ku stachyóze u semen je druhově

specifický. Poměr rafinózy ku stachyóze byl zachován i během degradace RFO v počátečních hodinách imbibice (graf 22). Poměr RFO ku sacharóze je také překvapivě podobný v obou pracech- zde $1,26 \pm 0,37$ pro celá semena a $1,24 \pm 0,29$ pro izolovaná ZE (Gösslová et al., 2001). Na rozdíl od poměru rafinózy ku stachyóze má poměr RFO ku sacharóze tendence k poklesu se stářím a životaschopností semen (viz kap. 2.5.1.2). Z hlediska poměru zastoupení jednotlivých RFO se SE smrku ztepilého lišila od ZE. Poměry byly značně odlišné a často dokonce protichůdné mezi jednotlivými opakováními.

Kombinace obou stresových faktorů vyvolala doposud nejvyšší popsanou kumulaci RFO v SEZ jehličnanů (graf 13A,13B,15). Gösslová et al. (2001) zjistili, že RFO představují jedno procento ze sušiny zralých ZE smrku ztepilého. Ve srovnání s těmito ZE obsahovala SE po ošetření kombinací postmaturačních ošetření aplikovaných současně až šestkrát vyšší hladiny RFO vztahované k hmotnosti sušiny zralých SE. Výše zmíněné poměry RFO ku sacharóze ($1,26 \pm 0,37$ pro celá semena a $1,24 \pm 0,29$ pro izolovaná ZE smrku ztepilého) byly současným chladovým a pomalým desikačním ošetřením u SE dalece přesaženy (graf 16B). Odchytky v tomto parametru byly ale u SE veliké. V případě některých odebraných vzorků SE současně ošetřených chladovým a pomalým desikačním ošetřením, byly zjištěny téměř nedetekovatelné hladiny sacharózy. U takových SE tvořilo RFO téměř veškerý pool endogenních rozpustných sacharidů a hodnoty poměru RFO ku sacharóze byly tak vysoké. Tyto výsledky ale jednoznačně potvrzují schopnost SE smrku ztepilého syntetizovat a kumulovat RFO ve vysokých hladinách ve svých pletivech. Také potvrzují, že v případě somatické embryogeneze smrku ztepilého je kumulace RFO ve vyšších hladinách indukována působením stresových faktorů (postmaturačních ošetření) a spojují zde tak funkci RFO zejména s úlohou ochrannou.

Aplikace postmaturačních ošetření přiblížila SE smrku ztepilého z hlediska sacharidového složení zralým semenům (graf 22; Gösslová et al., 2001). Degradace RFO v semenech patří k časně biochemické odezvě semen na imbibici (rehydrataci) (Downey a Bewley, 2000; Blöchl et al., 2007; 2008). Na mobilizaci RFO se podílejí α -galaktozidázy (Blöchl et al., 2008). Vzhledem k téměř obecnému charakteru (totální) degradace RFO v časných fázích klíčení semen, lze považovat analogickou degradaci RFO u SE za žádoucí. U SE smrku ztepilého bylo RFO na germinálním médiu neobsahujícím sacharid kompletně rozštěpeno během prvních 24 hodin od počátku klíčení (graf 18,20). Tedy v době, která by mohla být označena za lag fázi klíčení, a to z důvodu, že SE v tomto časovém intervalu nejevila žádné známky klíčení. O vysoké rychlosti degradace RFO u SE svědčí i skutečnost, že téměř dvojnásobná výchozí hladina RFO u SE v prvním provedení pokusu vzhledem k provedení druhému, neměla vliv na výslednou hladinu RFO po 24 h klíčení (v obou případech byla

hladina RFO po 24h klíčení nedetekovatelná (graf 18,20)). Vysoké rychlosti degradace RFO v raných fázích klíčení SE smrku ztepilého pozoroval také Kubeš (2004). Ve zmíněné práci ale docházelo v několika případech ke snížení rychlosti degradace po prvotním rychlém poklesu hladiny RFO v SE klíčících na germinačním médiu obsahujícím 1% sacharózu, což způsobilo, že RFO tvořilo významnou část endogenního spektra rozpustných sacharidů i po 48 h klíčení.

Vyšší rychlost degradace RFO a především jejich časnější vymizení ze spektra endogenních rozpustných sacharidů u SE ve srovnání se ZE (graf 22; *Picea glauca*- Downie a Bewley, 2000) by bylo možné vysvětlit zřejmě rychleji probíhající rehydratací SE konifer ve srovnání se ZE v semeni (Terskikh et al., 2005). Charakter průběhu degradace RFO u semen smrku ztepilého po imbibici byl srovnatelný se situací u semen *Picea glauca* (Downie & Bewley, 2000). Prudký propad hladiny RFO během prvních 24 h klíčení byl vystřídán poklesem míry degradace RFO. Downie a Bewley (2000) srovnávali od třetího dne po imbibici hladiny RFO u semen, která v čase odběru klíčila resp. neklíčila. Jednotlivé části (ZE, megagametofyt) semen, která v čase odběru klíčila měla tendence degradovat RFO rychleji oproti semenům neklíčícím, která v degradaci RFO stagnovala, nebo dokonce RFO kumulovala. Semena smrku ztepilého v intervalu mezi 0. až 72. hodinou od počátku imbibice stejně jako semena *Picea glauca* neklíčila (graf 23; Downie a Bewley, 2000). Navíc konečná klíčivost (synchronie klíčení) semen smrku ztepilého v pátém dni byla nízká (graf 23). Domnívám se proto, že pokles rychlosti degradace RFO u semen smrku ztepilého v intervalu mezi 24. až 72. h mohl být způsoben převahou semen v odebraných vzorcích, která se v nejbližší době klíčit nechystala.

Blöchl et al. (2007) prokázali úlohu galaktózy, produkované degradací RFO, patrně ve funkci zdroje energie pro rané fáze klíčení semen hrachu a navrhli i její možnou signální funkci. Semena leguminóz, a tudíž i hrachu, jsou známa akumulací ostatních galaktozylcyklitolů během svého zrání (Obendorf, 1997; Vidal-Valverde et al., 2002). O galaktozylcyklitolech se předpokládá, že vedle podobného metabolismu s RFO (Peterbauer a Richter, 2001) mají pravděpodobně i stejné funkce (Obendorf, 1997; Lahuta et al., 2005c). Na rozdíl od leguminóz, SE ani semena smrku ztepilého vedle RFO galaktozylcyklitoly nekumulují. Měly by proto být teoreticky i vhodnějším modelem pro testování úlohy RFO v raných fázích klíčení. Z tohoto důvodu byla testována rychlost nástupu klíčení semen a rychlost prodlužování hypokotyly SE smrku ztepilého v odpovědi na vyvolané změny rychlosti degradace (mobilizace) RFO během klíčení.

Pomocí aplikace DGJ lze kompletně blokovat degradaci RFO v raných fázích klíčení semen hrachu (Blöchl et al., 2007) (DGJ byl aplikován po celou dobu klíčení semen hrachu).

Pokud byl DGJ aplikován u SE smrku ztepilého v intervalu 0. až 2. hodina imbibice, došlo ke zpomalení degradace RFO v průběhu raných fází klíčení (graf 18,20). V případě semen smrku ztepilého došlo během prvních 24 hodin od počátku imbibice k degradaci RFO nezávislé na přítomnosti DGJ (graf 22) (zde byl DGJ aplikován po celou dobu klíčení). Příčina popsané odpovědi semen smrku zůstává nejasná, ale nabízí se vysvětlení vlivem ztiženého průchodu DGJ semennými obaly.

Na téměř stejný kvalitativní průběh degradace RFO u jednotlivých variant mezi opakováními pokusu reagovala SE smrku během klíčení protichůdnou odpovědí. V prvním případě, kdy měla SE pro mobilizaci k dispozici nižší zásobu RFO, byl zaznamenán počátek klíčení později (po 40. hodině od počátku imbibice, první klíčila SE využívající galaktózu z média) (graf 19) ve srovnání s opakováním pokusu, kde SE po rozštěpení vyšší hladiny RFO klíčila již po 29. hodině od počátku imbibice (zde klíčila první SE kontrolní varianty) (graf 21). Prodloužení lag fáze klíčení v prvním případě mohla kupříkladu způsobit nižší kvalita SE než v případě druhém, počátek klíčení v jiné fázi světelné periody až po možný testovaný vliv celkového kvanta mobilizovaného energetického poolu- RFO, který mohl lag fázi v druhém případě zkrátit. Tomu by do jisté míry nasvědčovala i vyšší celková hladina sacharidů v průběhu raných fází klíčení u opakování pokusu (graf 18x20). Blöchl et al. (2007) pozorovali, že galaktóza dodaná do média semenům hrachu spolu s DGJ revertovala z hlediska nástupu klíčení vliv DGJ, sacharóza tento vliv neměla. Vliv galaktózy na rostlinná pletiva, především taková, která jsou silným metabolickým sinkem může být různý, někdy je efekt galaktózy označován i za toxický (např. Kato et al., 2007). Rychlým metabolizmem galaktózy, který by přítomnou galaktózu „detoxifikoval“, si Downie a Bewley (2000) vysvětlují nízkou hladinu galaktózy v klíčících semenech *Picea glauca* i přes rychlou degradaci RFO. Předpokládá se, že u některých rostlin galaktóza svým metabolizmem negativně ovlivňuje produkci UDP-glukózy, a tím například inhibuje dlouhivý buněčný růst vyvolaný auxinem (Yamamoto et al., 1988). Na rozdíl od semen hrachu byla v případě SE smrku hladina galaktózy, kromě varianty využívající galaktózu z média, velice nízká (graf 18,20). Metabolismus galaktózy by se tak mohl mezi oběma systémy lišit.

Pozitivní vliv postmaturačních ošetření na klíčení je v literatuře dobře dokumentován (Kong a Yeung, 1992; Beardmore a Charest, 1995; Pond, 2005; von Aderkas et al., 2007). Konrádová et al. (2003) navrhuje chladové ošetření za alternativní ošetření k ošetření desikačním a domnívají se, že RFO mají alespoň částečný podíl na pozitivním působení desikačního ošetření. V prezentované práci vedlo u stejné embryogenní kultury chladové ošetření SE ke zlepšení průběhu klíčení, ale pouze v případě kultivace na PMM (není

prezentováno). Pokud SE podstoupila chladové ošetření po extirpci (bez zbytkové ESM) na TMM, docházelo ve většině případů ke zhoršení vývoje během klíčení ve srovnání s neošetřenou variantou. Standardní pomalé desikační ošetření samotné i v paralelní kombinaci s chladovým ošetřením vedlo ke zlepšení průběhu klíčení (graf 16A). Těsný vztah mezi výchozí hladinou RFO u SE před klíčením a vlastním průběhem klíčení u SE ale nalezen nebyl. Nicméně RFO jsou rychle degradovány během časných fází klíčení a během prvních 2-3 dnů zcela mizí ze spektra rozpustných nestrukturních sacharidů. Tedy nelze zcela vyloučit, že vztah mezi hladinou RFO a průběhem klíčení neexistuje, ale zřejmě během postmaturačních ošetření probíhají kromě syntézy RFO další změny, které jsou z tohoto pohledu významnější.

5.2. Somatická embryogeneze jedle (hybrid *Abies alba* x *Abies numidica*)

Další studovaný model metabolismu RFO během somatické embryogeneze jehličnanů představoval hybrid jedle (*Abies alba* x *Abies numidica*)- embryogenní linie AN72. Během proliferační fáze je preferována sacharóza dodaná do proliferačního média u obou pokusných embryogenních linií- jak smrku (AFO 541) tak i jedle (AN72). V rámci SEZ rodu *Abies* je známo, že embryogenní kultury často preferují maturační médium obsahující maltózu nad sacharózou (Nørgaard, 1997; Salaj et al., 2004). Tak tomu bylo i v provedených pokusech s embryogenní linií AN72 (obrázek 2). Pozitivní vliv maltózy na kulturu AN72 byl pozorován pouze při aplikaci maltózy s vyššími koncentracemi PEG aplikovanými do média (Salaj et al., 2004). Také u SEZ rodu *Picea* byl testován vliv maltózy na zrání SE u *Picea mariana* a *Picea rubens*. V případě SEZ *Picea mariana* došlo ke snížení výtěžnosti i kvality SE na PMM M ve srovnání s PMM S, kdežto u SEZ *Picea rubens* nebyl rozdíl průkazný (Tremblay a Tremblay, 1991).

Vliv sacharidu aplikovaného do maturačního média na změny ve spektru a hladinách zásobních proteinů kultury AN72 popsali Salaj et al. (2004). Ve sv práci sledoval dynamiku spekter endogenních rozpustných sacharidů v odpovědi na typ sacharidu v médiu.

Kultivace kultury AN72 během zrání na PMM vede ke kontrastním spektrům endogenních rozpustných sacharidů mezi variantami kultivovanými na PMM M a PMM S, ale také ve srovnání se zrající embryogenní kulturou smrku AFO 541. U ESM zrající na PMM M na rozdíl od ESM zrající na PMM S, dochází brzy, zřejmě záhy po přenesení na maturační médium, k ustavení spektra endogenních rozpustných sacharidů charakteristického pro zralá SE jedle (graf 24A,24B,24C). To znamená nízký poměr hladin hexóz ku hladině rozpustných disacharidů, ale také kumulaci RFO. Srovnáme-li tuto situaci se SEZ smrku, dochází již téměř

od počátku zrání kultury AN72 na PMM M k nastolení spektra endogenních rozpustných sacharidů charakteristického pro zralá a postmaturačně ošetřená SE smrku ztepilého, a to nejen v SE, ale i v rámci celé ESM. Tohoto spektra dosahují při kultivaci na PMM S zřejmě pouze zrající SE (měřeno v osmém týdnu zrání). Předběžné výsledky naznačují, že si ESM a posléze i zbytková ESM zrající na PMM S zřejmě zachovávají endogenní spektrum rozpustných sacharidů charakteristické pro proliferující ESM, tedy vysoký poměr hladin hexózu ku hladině sacharózy, a to až do konce zrání (graf 24B). Z tohoto pohledu bylo spektrum endogenních rozpustných sacharidů zrající ESM jedle na PMM S srovnatelné se situací pozorovanou u zrající zbytkové ESM smrku ztepilého (Lipavská et al., 2000a). Zdá se tedy, že kumulace RFO, alespoň v rámci samotných zrajících SE je u embryogenní linie AN72 obecným rysem nezávislým na typu sacharidu v médiu. To ale nelze říci o situaci v rámci celé ESM nebo o výsledné hladině RFO u SE jednotlivých pokusných variant.

Z naměřených dat u SEZ smrku ztepilého a z literárních zdrojů (viz. kap. 2.4.3.2.) se bylo možné domnívat, že vyšší dostupnost sacharózy z média, by mohla vést k vyšším výsledným hladinám RFO. ESM kultivovaná na PMM S by tak teoreticky byla z hlediska syntézy RFO zvýhodněna oproti ESM z PMM M. Ovšem je nutné mít na paměti, že může docházet k již zmíněnému štěpení sacharózy v samotném médiu v průběhu zrání kultury, jak bylo prokázáno u SEZ vícero druhů jehličnanů (*Picea mariana*-Tremblay a Tremblay, 1995; *Pseudotsuga menziesii*- Taber et al., 1998; *Picea glauca*- Iraqi a Tremblay, 2001a, *Picea abies*-Kubeš, 2004; Drážná 2006), což může případnou dostupnost sacharózy kultuře z PMM S výrazně ovlivnit. Zde je ovšem nutno připomenout, že ani vlastní způsob příjmu sacharózy somatickými embryi jehličnanů z média (intaktní, nebo extracelulární štěpení na hexózy, příjem hexózu a resyntéza sacharózy v buňce) zůstává neobjasněn (Lipavská et al., 2000a; Iraqi et al., 2005). Kultura jedle ale reagovala na typ sacharidu v médiu zcela opačně. K vyšší kumulaci RFO docházelo u ESM a posléze SE i zbytkové ESM kultivovaných během zrání na PMM M. Bohužel o poměrech hladin sacharózy a maltózy u SE jedle během zrání na PMM M v současné chvíli mnoho nevíme, protože na daném systému HPLC nebylo možné dostatečně oddělit sacharózu od maltózy.

Charakter spekter endogenních rozpustných sacharidů kultury během zrání nás do jisté míry informuje o působení typu sacharidu v médiu na kulturu jedle. O pozitivním působení maturačních médií obsahujících maltózu na kultury některých jehličnanů je často spekulováno na základě měření aktivit α -glukozidázové a invertázové aktivity u mikrospor ječmene, která provedli Scott et al. (1995). V této práci byla α -glukozidázová aktivita oproti invertázové 20x nižší. Autoři se z tohoto důvodu domnívají, že prospěšný efekt maltózy může být spojen s

navozením určitého mírného nutričního stresu. Také Blanc et al. (2002) vyslovili teorii u SEZ *Hevea brasiliensis*, že pomalejší hydrolyza maltózy kulturou a výsledná nižší hladina hexóz by mohla být biochemickým faktorem orientující metabolismus směrem k SEZ. Ve zrající ESM jedle na PMM M byla dostupnost hexóz alespoň v období formování struktur embryí ve srovnání se situací na PMM S výrazně nižší (graf 24A,24B,24C). Nelze ovšem tvrdit, že určité snížení hladin (dostupnosti) hexóz v ESM musí nutně vyvolávat nutriční stres. Jistá, do určité míry klíčová odpověď by mohla být dána endogenní hladinou sacharózy v ESM. Pokud by ESM metabolizovala maltózu a zároveň syntetizovala a kumulovala sacharózu v buňkách ve vyšších hladinách, nebylo by patrně možné přisoudit pozitivní působení maltózy na SEZ jedle právě navozením nutričního stresu.

Skutečnost, že ESM a posléze SE jedle zrající na PMM M dosahovala vyšších hladin RFO ve srovnání s PMM S a vzhledem k již zmíněným literárním údajům spojujícím metabolismus maltózy s nutričním stresem, nás vedly k testování poněkud kontroverzní domněnky u zralých SE smrku ztepilého. Zralá SE smrku ztepilého, tedy taková SE, u kterých lze vnějším zásahem v podobě stresoru indukovat kumulaci RFO, byla kultivána na TMM neobsahujícím sacharid za účelem navození určité míry nutričního stresu. Zmíněné ošetření způsobilo výrazný pokles celkové hladiny rozpustných sacharidů v SE, ale ke kumulaci RFO, coby sacharidů s domnělou zásobní funkcí pro rané fáze vývoje klíčících SE, u SE smrku ztepilého nevedlo (graf 3). Zjištěný výsledek je v souladu s pozorováním Carpenter et al. (2000), kde SE *Psuedotsuga menziesii* na konci zrání na médiu obsahujícím 18% PEG obsahovala nepatrně vyšší hladiny RFO na médiu s 2,5% maltózou a zároveň 1% glukózou oproti médiu s obsahem pouze 2,5% maltózy. Ovšem dosažené hladiny RFO v citované práci byly ve srovnání s hladinami u zrající kultury AN72 zanedbatelné. Poměr RFO ku sacharóze byl v obou případech blízký hodnotě 1:30 a u některých genotypů nebylo RFO kumulováno na médiu s obsahem 2,5% maltózy vůbec (Carpenter et al., 2000)

K negativním projevům kultivace kultury AN72 na PMM S patřilo časté hnědnutí zbytkové ESM v závěru zrání (obrázek 2). Pro ESM a posléze zbytkovou ESM této varianty byl typický již zmíněný vysoký poměr hladin hexóz ve srovnání s hladinami sacharózy a rychlý nárůst objemu (rychlost proliferace) po přenosu na PMM S na počátku zrání. Zmíněné spektrum endogenních rozpustných sacharidů u ESM a posléze u zbytkové ESM zrající na PMM S vykazují typicky silné metabolické sinky. Nørgaard (1997) pozoroval, že SE *Abies nordmanniana*, která uzrála na médiu obsahujícím sacharózu, po osmém týdnu zrání vitrifikují a hnědnou. Tento jev si autor vysvětluje rychlým metabolismem sacharózy, který může vyvolávat hypoxii ústící v kumulaci etanolu, který následně může působit na kulturu toxicky

(Nørgaard, 1997). S touto představou by byl v souladu vedle hnědnutí zbytkové ESM v závěru zrání i přechodný nárůst ESM v počátečních fázích zrání na PMM S.

Dosažená spektra endogenních rozpustných sacharidů u SE jedle nelze porovnat se spektry adekvátní ZES. Pokud je mi známo, doposud nebylo publikováno spektrum endogenních rozpustných sacharidů u vyvíjejících se ZE u žádného ze zástupců rodu *Abies*. Kumulace RFO již během strukturálního vývoje ZE byla zjištěna u ZE *Pinus taeda* (Pullman a Buchanan, 2008). Podobné spektrum endogenních rozpustných sacharidů, jako v případě zralých SE kultury AN72 po zrání na PMM M, pozoroval Hudec (2002) u tří embryogenních linií *Abies alba* (Al 1, AADR 4, Al 3). Tyto linie vykazovaly ve srovnání s kulturou AN72 nízký embryogenní potenciál. Všechny tři linie kumulovaly již od raných fází zrání sacharidy, které na HPLC komigrovaly s RFO. Na základě nízké kvality dosažených zralých SE autor navrhoval, že z vývojového hlediska by taková výrazně předčasná kumulace domnělých RFO, v porovnání se situací u SEZ smrku ztepilého, mohla být příčinou určité blokace maturačního programu jedle. Ovšem vzhledem k podstatně většímu výtěžku SE i jejich vyšší kvalitě z PMM M a vyšší hladině RFO ve srovnání se SE z PMM S u linie jedle AN72 (obrázek 2, graf 24A,24B,24C), lze považovat kumulaci RFO i nastolení spektra endogenních rozpustných sacharidů podobného situací u zralých SE jedle, záhy po přenosu na PMM, spíše za žádoucí.

Pokud RFO nebylo přirozenou součástí spektra endogenních rozpustných sacharidů během somatické embryogeneze jedle, co by mohlo vyvolat předčasnou kumulaci RFO v průběhu zrání ESM jedle ve vysokých hladinách? Hlavním rozdílem ve složení maturačního média pro embryogenní linii jedle AN72 a smrku AFO 541 je přítomnost 10% PEG ($M_r=4000$) v maturačním médiu jedle. Zde je nutno zmínit, že při SEZ *Picea abies* byl prokázán škodlivý vliv již 7,5% PEG v maturačním médiu a jeho optimální koncentrace v médiu byla stanovena na 5 % (Svobodová, nepublikovaná data). Bomal et al. (2002) zjistili, že již při mírném poklesu obsahu vody u zralých SE *Picea mariana* dochází k indukci složek tolerance k rychlé desikaci, mimo jiné dochází i k indukci kumulace RFO. Již po dvou dnech desikace v atmosféře při 97% RH jsou SE připravena plně tolerovat rychlé desikační ošetření (Bomal et al., 2002). Attree et al. (1995) předvedli, že lze indukovat toleranci k desikaci u SE *Picea glauca* zráním na maturačním médiu obsahujícím 7,5% Peg ($M_r=4000$). Také Bomal a Tremblay (1999) si vysvětlují srovnatelné klíčení desikačně ošetřených i neošetřených SE *Picea mariana* kultivačními podmínkami během zrání, které mohly způsobit částečnou dehydrataci kultury již v této fázi SEZ. Jak již bylo zmíněno u zralých postmaturačně neošetřených SE *Pseudotsuga menziesii* a *Pinus taeda* byla skutečně prokázána kumulace RFO, ale pouze v nízkých hladinách

(Carpenter et al., 2000). V opozici k tomuto předpokladu ale stojí skutečnost, že ESM ani vlastní dozrávající, případně zralá SE *Picea abies* (embryogenní linie AFO 541 a C110) nekumulují RFO v odpovědi na snížení obsahu vody vlivem aplikace PEG do maturačního média. Zmíněné hladiny PEG aplikované do maturačního média u smrku ztepilého nedosahují z výše zmíněných důvodů 10 %, ale v případě již zmíněné práce Hudec (2002) kde docházelo ke kumulaci domnělých RFO během zrání SE *Abies alba* byl aplikován pouze 1,875% PEG. Navíc tato představa by nevysvětlovala vyšší hladiny RFO u ESM resp. SE z PMM M oproti PMM S.

V postmaturačních fázích vývoje jedle, během desikačního ošetření byla kumulace RFO výrazněji podporována u SE, která uzrála naopak na PMM S. Kvantitativně se hladiny RFO během ošetření příliš nezměnily, ale ve spektru RFO výrazně vzrostl podíl stachyózy. V některých případech došlo pravděpodobně i ke kumulaci verbaskózy, jejíž výskyt je obecně v pletivech jehličnanů spíše vzácný. Tyto výsledky naznačují, že ačkoli jsou RFO součástí spektra endogenních rozpustných sacharidů patrně v průběhu celého zrání SE, desikační ošetření především kvalitativně metabolismus RFO u SE mění. To také naznačuje, že se úloha RFO v této fázi vývoje mění. Třítýdenní klíčící rostliny jedle se absencí RFO ve svém spektru endogenních rozpustných sacharidů opět přiblížily k situaci známé u třítýdenních klíčících rostlin smrku ztepilého (graf 25A,B; Kubeš 2004).

Utlumení metabolické aktivity buněk je považováno za jednu z důležitých složek tolerance k desikaci ortodoxních semen (Leprince et al., 1995, 1999, 2000). Předpoklad, že RFO jsou během postmaturačních fází syntetizovány za účelem určitého řízeného ukládání monosacharidů, které by vedlo ke snížení dostupnosti monosacharidů pro respiraci v buňce a následnému utlumení metabolismu v buňce (Leprince et al., 1992; Pammenter a Berjak., 1999), nebyla v případě SE smrku ztepilého ani hybridu jedle (*Abies alba* x *Abies numidica*) potvrzena. Ve většině případů byla výsledná hladina glukózy dokonce vyšší u takových SE, která obsahovala vyšší hladiny RFO. A také proto, že v případě postupné aplikace dvou či tří postmaturačních ošetření nebo prodlouženého šestitýdenního chladového ošetření docházelo ve srovnání se standardními třítýdenními postmaturačními ošetřeními k poklesu celkových hladin endogenních rozpustných sacharidů. To naznačuje, že SE byla po celou dobu postmaturačních ošetření metabolicky aktivní. Ke snížení hladin hexóz by také mělo dojít z důvodu schopnosti redukujících sacharidů, a tedy i hexóz, poškozovat proteiny v období sníženého obsahu vody v buňce. V tomto stavu buňky mohou redukující sacharidy iniciovat nežádoucí neenzymatické glykozylace volných aminových skupin proteinů.

Zjištěné výsledky ukazují, že dynamika endogenních rozpustných sacharidů během somatické embryogeneze jehličnanů se výrazně liší v závislosti na druhu/genotypu. U obou druhů/genotypů je syntéza RFO závislá na podmínkách vnějšího prostředí. Během somatické embryogeneze jedle jsou RFO součástí endogenního spektra rozpustných sacharidů již v průběhu zrání a jejich hladiny jsou výrazně závislé na typu sacharidu dodaného do média. V případě SEZ smrku ztepilého se RFO kumulují až v odpovědi na stresové působení postmaturačních ošetření. V rámci somatické embryogeneze jehličnanů proto nebude možné vytvoření obecného modelu kumulace RFO.

6. ZÁVĚRY

Smrk ztepilý

Kumulace RFO během zrání

- Kultivace SE na pevném médiu s rafinózou (1,5% sacharóza + ekvimolární množství rafinózy) v pozdní fázi zrání (6. týden) nevede k navýšení hladiny RFO.
- Kultivace SE na tekutém maturačním médiu v 7. týdnu zrání vede k mírné kumulaci RFO, která může být dále posílena extirpcí embryí

Kumulace RFO během postmaturačních ošetření

- Postmaturační ošetření vyvolávají akumulaci RFO ve významných hladinách
- Hladiny RFO stoupají v závislosti na typu ošetření v tomto pořadí:

bez ošetření < chlad < desikace < chlad → desikace < $\begin{matrix} \text{chlad} \\ \text{desikace} \end{matrix}$

-tedy s intenzitou působícího stresoru

- Postmaturační akumulaci RFO lze posílit optimalizací koncentrace myo-inositolu v maturačním médiu (0,2-0,6%)
- Navýšení endogenních hladin galaktózy během zrání neposílí kumulaci RFO během postmaturačních ošetření.

Klíčení

- RFO jsou degradovány/využity během nejčasnějších fází klíčení
- Vyšší výchozí hladiny RFO (indukované modifikacemi ošetření během zrání a postmaturačních ošetření) nebyly ve všech případech spojeny s lepším průběhem klíčení
- Aplikací 1-deoxygalactonojirimycinu (DGJ) lze u SE přinejmenším částečně inhibovat štěpení RFO α -galaktozidázou
- Zpomalení degradace RFO pomocí DGJ nevedlo k negativnímu ovlivnění klíčení

- ❖ Modifikací podmínek zrání a postmaturačním ošetřením lze významně ovlivnit hladiny RFO v embryích před klíčením
- ❖ Výsledky nepotvrzují těsný vztah mezi hladinou sacharidů rafinóзовé řady a efektivitou klíčení somatických embryí

Jedle (hybrid *Abies alba* x *Abies numidica*)

- Zrání embryí je ovlivněno typem sacharidu (sacharóza, maltóza) v médiu - výrazně větší množství embryí se vytváří na médiu s maltózou
 - Embrya zrající na maltóze vykazují již v časných fázích
 - vysoké hodnoty poměru disacharid: hexózy
 - kumulaci RFO, patrně nejen v embryích, ale v celé ESM
 - Embrya zrající na sacharóze
 - zachovávají vysoký obsah hexóz po celou dobu zrání
 - kumulují RFO v nízkých hladinách
 - Postmaturační ošetření nevede k výrazným změnám hladiny RFO, zvyšuje se pouze zastoupení stachyózy ve spektru
-
- ❖ **Zrání embryí a dynamika obsahu a spektra sacharidů jsou výrazně ovlivněny typem sacharidu dodaného do média**
 - ❖ **Profily akumulace RFO se podstatně odlišují u obou sledovaných druhů *Picea abies* a hybridu *Abies alba* x *Abies numidica***

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Asano N., Ishii S., Kizu H., Ikeda K., Yasuda K., Kato A., Martin O. R., Fan J-Q.: *In vitro* inhibition and intracellular enhancement of lysosomal α -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives.- Eur. J. Biochem, **267**: 4179-4186, 2000
- Attree S. M., Moore D., Sawhney V. K., Fowke L. C.: Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos: effects of nonplasmolysing water stress and abscisic acid.- Ann. Bot. **68**: 519-525, 1991
- Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.: Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. – Planta, **187**: 395-404, 1992
- Attree S. M., Fowke L. C.: Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **35**: 1-35, 1993
- Attree S. M., Fowke L. C.: US patent 5464769: Desiccated conifer somatic embryos.- 1995, <http://www.patentstorm.us/patents/5464769/fulltext.html>
- Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.: Development of white spruce (*Picea glauca* [Moensch.] Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmotikum, and their tolerance to drying and frozen storage. – Journal of Experimental Botany, **46**: 433-439, 1995
- Bachmann M., Matile P., Keller F.: Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. – Plant Physiology, **105**: 1335-1345, 1994
- Bachmann M., Keller F.: Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Inter- and intracellular compartmentation.- Plant Physiology, **109**: 991-998, 1995
- Bailly C., Audigier C., Ladonne F., Wagner M. H., Coste F., Corbineau F., Côme D.: Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality.- Journal of experimental biology, **52**: 701-708, 2001
- Bailly C., El-Maarouf-Boutteau H., Corbineau F.: From intracellular signalling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology.- Comptes Rendus Biologies, **331**: 806-814, 2008
- Bachmann M., Matile P., Keller F.: Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L cold acclimation, translocation, and sink to source transition- discovery of chain elongation enzyme.- Plant Physiology, **105**: 1335-1345, 1994
- Beardmore T., Charest P. J.: 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, 1995
- Berjak P.: Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms.- Seed Science Research, **16**: 1-15, 2006
- Bernal-Lugo L., Leopold A.C.: Changes in soluble carbohydrates during seed storage.- Plant physiology, **98**: 1207-1210, 1992
- Bernal-Lugo L., Leopold A. C.: Seed stability during storage- raffinose content and seed glassy state.- Seed Science Research, **5**: 75-80, 1995
- Bewley J. D., Blac M.: Seeds: Physiology of development and germination, New York: Plenum Press, 1994- citováno podle: Blöchl A., Peterbauer T., Richter A.: Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds.- Journal of Plant Physiology, **164**: 1093-1096, 2007

- Bewley J. D., Black M.:** Seeds. Physiology of development and germination, 2nd edn. New York: Plenum Press-citováno dle: **Berjak P., Pammenter N. W.:** From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective.- *Annals of Botany*, **101**: 213-228, 2008
- Bies-Ethève N., Gaubier-Comella P., Debures A., Lasserre E., Jobet E., Raynal M., Cooke R., Delseny M.:** Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*.- *Plant Molecular Biology*, **67**: 107-124, 2008
- Black M., Corbineau F., Gee H., Come D.:** Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos.- *Plant Physiology*, **120**: 463-471, 1999
- Blanc G., Lardet L., Martin A., Jacob J. L., Carron M. P.:** Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.).- *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1453-1462, 2002
- Blöchl A., Grenier-de March G., Sourdioux M., Peterbauer T., Richter A.:** Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.).- *Plant Science*, **168**: 1075-1082, 2005
- Blöchl A., Peterbauer T., Richter A.:** Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds.- *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1093-1096, 2007
- Blöchl A., Peterbauer T., Hofmann J., Richter A.:** Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds.- *Planta*, **228**: 99-110, 2008
- Bomal C., Tremblay F. M.:** 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, 1999
- Bomal C., Le Q. V., Tremblay F. M.:** Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins.- *Physiologia Plantarum*, **115**: 523-530, 2002
- Bozhkov P. V., von Arnold S.:** Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos.- *Physiologia Plantarum* **104**: 211-224, 1998
- Brownfield D. L., Todd C. D., Stone S. L., Deyholos M. K., Gifford D. J.:** Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation.- *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **88**: 217-223, 2007
- Buitink J., Walter C., Hoekstra F. A., Crane.:** Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents: Interpretation on the basis of water activity and glass concepts.- *Physiologia Plantarum*, **103**: 145-154, 1998
- Buitink J., Hemminga M.A., Hoekstra F. A.:** Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of intracellular glass stability.- *Plant Physiology*, **122**: 1217-1224, 2000
- Buitink J., Leprince O.:** Intracellular glasses and seed survival in the dry state.- *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 788-795, 2008
- Caffrey M., Fonseca V., Leopold A. C.:** Lipid- Sugar Interactions. – *Plant Physiology*, **86**: 754-758, 1988
- Carpenter C. V., Koester M. K., Gupta P. K.:** US patent 6117678: Method for determining maturity of conifer somatic embryos.- 2000, www.patentstorm.us/patents/6117678/fulltext.html
- Carrier D. J., Cunningham J. E., Taylor D. C., Dunstan D. L.:** Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. – *Plant Cell Reports*, **16**: 550-554, 1997

- Chalupa V.:** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from culture immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. – *Communicationes Instituti Forestalis Čechosloveniae*, **14**: 57-63, 1985
- Close T. J.:** Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins.- *Physiologia Plantarum*, **97**: 795-803, 1996
- Dai N., Petreikov M., Portnoy V., Katzir N., Pharr D. M., Schaffer A. A.:** Cloning and Expression Analysis of a UDP-Galactose/Glucose Pyrophosphorylase from Melon Fruit Provides Evidence for the Major Metabolic Pathway of Galactose Metabolism in Raffinose Oligosaccharide Metabolizing Plants.- *Plant Physiology*, **142**: 294-304, 2006
- Downie B., Bewley J. D.:** Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination.- *Physiologia plantarum*, **110**: 1-12, 2000
- Downie B., Gurusinghe S., Dahal P., Thacker R. R., Snyder J. C., Nonogaki H., Yim K., Fukanaga K., Alvarado V., Bradford K. J.:** Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented.- *Plant Physiology*, **131**: 1347-1359, 2003
- Drážná N.:** Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): Ovlivnění výtěžků a kvality embryí změnami v dostupnosti sacharidů během zrání na tekutých médiích.- Diplomová práce, PFF UK, 2006
- Dyachok J. V., Wiweger M., Kenne L., von Arnold S.:** Endogenous Nod-Factor-Like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce.- *Plant physiology*, **128**: 523-533, 2002
- Egertsdotter U., Mo L. H., von Arnold S.:** Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*).- *Physiologia Plantarum* **88**: 315-321, 1993
- Egertsdotter U., von Arnold S.:** Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*).- *Physiologia Plantarum*, **93**: 334-345, 1995
- Egertsdotter U., von Arnold S.:** Development of somatic embryos in Norway spruce.- *Journal of Experimental Botany*, **49**: 155-162, 1998
- Feirer R.P., Conkey J.H., Verhagen S.A.:** Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos.- *Plant Cell Reports*, **8**: 207-209, 1989
- Feusi M. E. S., Burton J. D., Williamson J. D., Pharr D. M.:** Galactosyl-sucrose metabolism and UDP-galactose pyrophosphorylase from *Cucumis melo* L. fruit.- **106**: 9-16, 1999
- Find J. L.:** Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination.- *Plant Science*, **128**: 75-83, 1997
- Find J. L., Norgaard J. V., Krogstrup P.:** Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture.- *Journal of Plant Physiology*, **152**: 510-517, 1998
- Franzini A., Galleghi L., Saviozzi F., Pinzino C., Izzo R., Sgherri C., Navari-Izzo F.:** Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation.- *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 556-563, 2006
- Galerie M., Bercetche J., Dereuddre J.:** Cryoconservation of embryogenic callus of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst)- influence of different factors on callus recovery and on embryo and plant production.- *Bulletin de la Societe Botanique de France- Lettres Botaniques*, **139** (4-5):331-344; 1992
- Gilbert G.A., Wilson C., Madore M.A.:** Root-Zone Salinity Alters Raffinose Oligosaccharide Metabolism and Transport in *Coleus*.- *Plant Physiology*, **115**: 1267-1276, 1997

- Gilles G. J., Hines K. M., Manfre A. J., Marcotte W. R.:** A predicted N-terminal helical domain of a Group of 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying.- *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 389-399, 2007
- Golovina E. A., Hoekstra F. A., Hemminga M. A.:** Drying increases intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase- Impact on membrane permeability and significance for desiccation tolerance.- *Plant Physiology*, **118**: 975-986, 1998
- Golovina E. A., Hoekstra F. A.:** Acquisition of desiccation tolerance in developing wheat embryos correlates with appearance of a fluid phase in membranes.- *Plant Cell and Environmental*, **26**: 1815-1826, 2003
- Gomes C. I., Obendorf R. L., Horbowicz M.:** myo-inositol, D-chiro-inositol, and D-pinitol synthesis, transport, and galactoside formation in soybean explants.- *Crop Science*, **45**: 1312-1319, 2005
- Gorbatenko O., Hakman I.:** Desiccation-tolerant somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets.- *International Journal of Plant Sciences*, **162**: 1211-1218, 2001
- Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A.:** Lea proteins prevent protein aggregation due to water stress. – *Biochemical Journal*, **388**: 151-157, 2005
- Gösslová M., Svobodová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.:** Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo formation. – *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, **37**: 24-28, 2001
- Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelange-Macherel M. H., Grunwald D., Macherel D.:** Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying.- *Plant Physiology*, **137**: 157-167, 2005
- Grigová M.:** Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst): studium dynamiky vybraných zásobních látek.- Diplomová práce, PFF UK; 2003
- Grigová M., Kubeš M., Drážná N., Řezanka T., Lipavská H.:** Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses.- *Tree physiology*, **27**: 1533-1540, 2007
- Gutmann M., von Aderkas P., Label P.:** Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch.- *Journal of Experimental Botany*, **47**: 1905-1917, 1996
- Hakman I., von Arnold S.:** Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). – *Journal of Plant Physiology*, **121**: 149-158, 1985
- Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T.:** The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). – *Plant Science*, **38**: 53-59, 1985
- Hakman I., von Arnold S.:** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce).- *Physiologia Plantarum*, **72**: 579-587, 1988
- Hakman I., Stabel P., Engström P., Eriksson T.:** Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce).- *Physiologia Plantarum*, **80**: 441-445, 1990
- Hakman I.:** Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and seed development and somatic embryogenesis. – *Physiologia Plantarum*, **87**: 148-159, 1993
- Hannah M. A., Zuther E., Buchel K., Heyer A. G.:** Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato.- *Journal of Experimental Botany*, **57**: 3801-3811, 2006
- Haritatos E., Keller F., Turgeon R.:** Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implication for phloem loading.- *Planta*, **198**: 614-622, 1996

- Hinesley L.E., Pharr D.M., Snelling L.K., Funderburk S.R.:** Foliar Raffinose and Sucrose in Four Conifer Species: Relationship to Seasonal temperature.- J. Amer. Soc. Hort. Sci., 117: 852-855, 1992
- Hoekstra F. A., Golovina E. A, Buitink J.:** Mechanisms of plant desiccation tolerance.- Trends in Plant Science., 6: 431-439, 2001
- Hoekstra F.A., Golovina E.A.:** The role of amphiphiles.- Comparative Biochemistry and Physiology a Molecular and Integrative Physiology.- 131: 527-533, 2002
- Hoch G., Peterbauer T., Richter A.:** Purification and characterization of stachyose synthase from lentil (*Lens culinaris*) seeds: galactopinitol and stachyose synthesis.- Archives of Biochemistry and Biophysics, 366: 75-81, 1999
- Horbowicz M., Obendorf R. L.:** Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence- producing oligosaccharides and cyclitols.- Seed Science Research, 4: 385-405, 1994
- Horbowicz M, Brenac P., Obendorf R. L.:** Fagopyritol B1, O-alpha-D-galactopyranosyl-(1-2)-D-chiro-inositol, a galactosylcyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance.- Planta, 205: 1-11, 1998
- Hudec L.:** Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) a jedle bělokoré (*Abies alba* Miller): potenciální ukazatele zdárného vývoje somatických embryí.- Diplomová práce, PFF UK; 2002
- Iraqi D., Tremblay F. M.:** The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos.- Physiologia Plantarum, 111: 381-388, 2001a
- Iraqi D., Tremblay F. M.:** Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. – Journal of Experimental Botany, 52: 2301-2311, 2001b
- Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S., Tremblay F. N.:** Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplasmic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. – Journal of Plant Physiology, 162: 115-124, 2005
- Jain S. M., Newton R. J., Soltes E. J.:** Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.).- Theor. Appl. Genet., 76: 501-506, 1988
- Jalonon P., von Arnold S.:** Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation.- Plant Cell Reports, 10: 384-387, 1991
- Jensen U., Chen L. X.:** *Abies* seed ptein profile divergent from other *Pinaceae*.- Taxon, 40: 435-440, 1991
- Joy IV R.W., Yeung E.C., Kong L., Thorpe T.A.:** Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition.-In vitro cellular and developmental biology, 27P: 32-41, 1991
- Kandler O., Hopf H.:** Occurrence, metabolism, and function of oligosaccharides.- Preiss, J. (Ed.) The biochemistry of plants, 3, Carbohydrates: structure and function. New York, Academic Press, 1980, citována dle **Peterbauer T., Richter A.:** Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds.- Seed Science Research, 11: 185-197, 2001
- Karner U., Peterbauer T., Raboy V., Jones D. A., Hedley C. L., Richter A.:** myo-inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds.- Journal of Experimental Botany, 55: 1981-1987, 2004
- Kato A., Tohyama H., Joho Masanori, Inouhe M.:** Different effects of galactose and mannose on cell proliferation and intracellular soluble sugar levels in *Vigna angularis* suspension cultures.- Journal of Plant Research, 120: 713-719, 2007
- Keller F., Matile P.:** The role of the vacuole in storage and mobilization of stachyose in tubers of *Stachys sieboldii*.- Journal of Plant Physiology, 119: 369-380, 1985

- Keller F.:** Galactinol Synthase is an Extravacuolar Enzyme in Tubers of Japanese Artichoke (*Stachys sieboldii*).- *Plant Physiology*, **99**: 1251-1253, 1992
- Keller F., Pharr D. M.:** Metabolism of carbohydrates in sink and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides.- v Zamski, E.; Schaffer A. A. (Eds) Photoassimilate distribution in plants and crops. New York, Marcel Dekker,: 115-184, 1996
- Keller R., Brearley C. A., Trethewey R. N., Muller-Rober B.:** Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase.- *Plant Journal*, **16**: 403-410, 1998
- Kermode A. L., Bewley J. D.:** The Role of Maturation Drying in the Transition from Seed Development to Germination: II Post-germinative enzyme production and soluble protein synthetic pattern changes within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds.- *Journal of Experimental Botany*, **36**: 1916-1927, 1985
- Kermode A. L.:** Role of Abscisic acid in Seed Dormancy.- *Journal of Plant Growth Regulation*, **24**: 319-344, 2005
- King J. E., Gifford D. J.:** Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth. 1. Arginine and arginase activity.- *Plant physiology*, **113**: 1125-1135, 1997
- Klimaszewska K., Morency F., Jones-Owerton C., Cooke J.:** Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments.- *Physiologia Plantarum*, **121**: 682-690, 2004
- Kong L. S., Yeung E. C.:** Development of white spruce somatic embryos. 2. Continual shoot meristem development during germination.- *In vitro cellular & developmental biology- plant*, **28P**: 125-131, 1992
- Kong L. S., Yeung E. C.:** Effects of silver-nitrate and polyethylene-glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development- enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content.- *Physiologia Plantarum*, **93**: 298-304, 1995
- Kong L. S., Attree S. M., Fowke L. C.:** Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*.- *Physiologia Plantarum*, **101**: 23-30, 1997
- Kong L. S., von Aderkas P.:** Genotype effects on ABA consumption and somatic embryo maturation in interior spruce (*Picea glauca x engelmanni*).- *Journal of Experimental Botany*, **58**: 1525-1531, 2007
- Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhyl D.:** Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzymes activities. – *Journal of Plant Physiology*, **159**: 387-396, 2002
- Konrádová H., Grigová M., Lipavská H.:** Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*).- *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, **39**: 425-427, 2003
- Kormuťák A., Salaj T., Vooková B.:** Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir.- *Biologia*, **61**: 479-486, 2006
- Koster K.:** Glass formation and desiccation tolerance in seeds.- *Plant Physiology*, **96**: 302-304, 1991
- Koster K. L., Webb M. S., Bryant G., Lynch D. V.:** Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration-vitrification of sugars alters the phase-behaviour of the phospholipid.- *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, **1193**: 143-150, 1994
- Koster K. L., Lei Y. P., Anderson M., Martin S., Bryant G.:** Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transition.- *Biophysical Journal*, **78**: 1932-1946: 2000
- Koster K. L., Bryant G.:** Dehydration in model membranes and protoplasts: contrasting effects at low, intermediate and high hydrations, publikováno v: *Chen T. H. H., Uemura M., Fujikawa S, eds.: Cold hardiness in plants: molecular genetics, cell biology and physiology*, Wallingford, UK: CAB International, 219-234, citováno

- de: **Berjak P., Pammenter N. W.:** From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective.- *Annals of Botany*, **101**: 213-228, 2008
- Kreuger M., van Holst G. J.:** Arabinogalactan-proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.- *Planta*, **189**: 243-248, 1993
- Kubeš M.:** Vliv aplikace exogenních sacharidů na proces somatické embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.).- Diplomová práce, PFF UK; 2004
- Kuo T. M., Lowell C. A., Nelsen T. C.:** Occurrence of pinitol in developing soybean seed tissue.- *Phytochemistry*, **45**: 29-35, 1997
- Label P., Lelu M. A.:** Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix leptoeuropea*) somatic embryos.- *Physiologia Plantarum*, **109**: 456-462, 2000
- Lahuta L. B., Górecki R. J., Horbowicz.:** High concentrations of D-pinitol or D-chiro-inositol inhibit the biosynthesis of raffinose family oligosaccharides in maturing smooth tare (*Vicia tetrasperma* [L.] Schreb.) seeds.- *Acta Physiologiae Plantarum*, **27**: 505-513, 2005a
- Lahuta L. B., Horbowicz M., Gojlo E., Goszczyńska J., Górecki R. J.:** Exogenously applied D-pinitol and D-chiro-inositol modifies the accumulation of α -D-galactosides in developing tiny vetch (*Vicia hirsuta* [L.] S. F. Gray) seeds.- *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **74**: 287-296, 2005b
- Lahuta L. B., Górecki J., Gojlo, Horbowicz M.:** Differences in accumulation of soluble α -galactosides during seed maturation of several *Vicia* species.- *Acta Physiologiae Plantarum*, **27**: 163-171, 2005c
- Lahuta L. B.:** Biosynthesis of raffinose family oligosaccharides and galactosyl pinitols in developing and maturing seeds of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.).- *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **75**: 219-227, 2006
- Lalonde S., Tegeder M., Throne-Holst M., Frommer W. B., Patrick J.W.:** Phloem loading and unloading of sugars and amino acids.- *Plant Cell and Environment*, **26**: 36-57, 2003
- Leal L., Misra S.:** Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination III. Analysis of crystalloid protein mRNAs and desiccation protein mRNAs in the developing embryo and megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss).- *Plant Science*, **88**: 25-37, 1993
- Leal L., Misra S., Attree S. M., Fowke L. C.:** Effect of abscisic-acid, osmotikum and desiccation on 11S storage protein gene-expression in somatic embryos of white spruce.- *Plant Science*, **106**: 121-128, 1995
- Lehle L., Tanner W.:** The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose. Purification and characterization of galactinol: sucrose 6-galactosyltransferase from *Vicia faba* seeds.- *European journal of biochemistry*, **38**: 103-110, 1973
- Lehner A., Bailly C., Fleche B., Poels P., Come D., Corbineau F.:** Changes in wheat seed germination ability, soluble carbohydrate and antioxidant enzyme activities in the embryo during the desiccation phase of maturation.- *Journal of Cereal Science*, **43**: 175-182
- Lelu M. A., Klimaszewska K., Pflaum G., Bastien C.:** Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix leptoeuropea* Dengler) somatic embryos.- *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, **31**: 15-20, 1995
- Leprince O., Vanderwerf A., Deltour R., Lambers H.:** Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars.- *Physiologia Plantarum*, **85**: 581-588, 1992
- Leprince O., Atherton N. M., Deltour R., Hendry G. A. F.:** The involvement of respiration in free-radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L- an electron-paramagnetic-resonance study.: *Plant Physiology*, **104**: 1333-1339, 1994
- Leprince O., Vertucci C. W., Hendry G. A. F., Atherton N. M.:** The expression of desiccation-induced damage in orthodox seeds is a function of oxygen and temperature.- *Physiologia Plantarum*, **94**: 233-240, 1995

- Leprince O., Buitink J., Hoekstra F. A.:** Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. Exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. - *Journal of experimental botany*, **50**: 1515-1524, 1999
- Leprince O., Harren F. J. M., Buitink J., Alberda M., Hoekstra F.A.:** Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. - *Plant Physiology*, **122**: 597-608, 2000
- Li S. H., Li T. P., Kim W. D., Kitaoka M., Yoshida S., Nakajima M., Kobayashi.:** Characterization of raffinose synthase from rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare). - *Biotechnology Letters*, **29**: 635-640, 2007
- Lin T. P., Huang N. H.:** The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. - *Journal of experimental botany* **45**: 1289-1294, 1994
- Lin X., Leung D. W. M.:** Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part I: Factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. - *In vitro cellular and developmental biology-Plant*, **38**: 191-197, 2002a
- Lin X., Leung D. W. M.:** Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part II: Biochemical changes associated with the conversion of the isolated embryos. - *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, **38**: 198-202, 2002b
- Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J., Kumštýřová L., Vágner M., Vondráková Z.:** Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. - *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant*, **36**: 260-267, 2000a
- Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J.:** Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. - *Journal of Plant Physiology*, **157**: 365-373, 2000b
- Lipavská H., Konrádová H.:** Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. - *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **40**: 23-30, 2004
- Liu J.J.J., Odegard W., de Lumen B.O.:** Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. - *Plant Physiology*, **109**: 505-511, 1995
- Liu J.J.J., Krenz D.C., Galvez A.F., de Lumen B.O.:** Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. - *Plant Science*, **134**: 11-20, 1998
- McKersie B. D.:** Desiccation stress. - www.Cropsoil.psu.edu/Courses/Agro518/Desiccat.htm, 1996
- Misra S., Green M. J.:** Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. II. Crystalloid protein synthesis in the developing embryo and megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss.). - *Plant Science*, **78**: 61-71, 1991
- Misra S., Attree S. M., Leal I., Fowke L. C.:** Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. - *Annals of Botany*, **71**: 11-22, 1993
- Misra S.:** Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination. *Biochemical and molecular advances*. - *Seed Science Research*, **4**: 357-384, 1994
- Mo L. H., Egertsdotter U., von Arnold S.:** Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. - *Annals of Botany.*, **77**: 143-152, 1996
- Muzquiz M., Burbano C., Mercedes M. P., Folkman W., Gulewicz K.:** Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides preparative method for their isolation and purification. - *Industrial Crops and Products*, **19**: 183-188, 1998

- Nørgaard J.:** Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. – *Plant Science*, **124**: 211-221, 1997
- Obendorf R. L.:** Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. – *Seed Science Research*, **7**: 63-74, 1997
- Obendorf R. L., Odorcic S., Ueda T., Coseo M. P., Vasallo E.:** Soybean galactinol synthase forms fagopyritol B1 but not galactopinitols: substrate feeding of isolated embryos and heterologous expression.- *Seed Science Research*, **14**: 321-333, 2004
- Ooms J. J. J., Leonkloosterziel K. M., Bertels D., Koorneef M., Karssen C. M.:** Acquisition of desiccation tolerance and longevity i seeds of *Arabidopsis thaliana*- a comparative study using abscisic acid insensitive ABI3 mutants.- *Plant Physiology*, **102**: 1185-1191, 1993
- Ooms J. J. J., Vanderveen R., Karssen C. M.:** Abscisic-acid and osmotic-stress or slow drying independently induce dessication tolerance in mutant seeds of *Arabidopsis thaliana*.- *Physiologia Plantarum*, **92**: 506-510, 1994
- Pammerter N. W., Berjak P.:** A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms.- *Seed Science Research*, **9**: 13-37, 1999
- Paniculangara T. J., Eggers-Schumacher G., Wunderlich M., Stransky H., Schoffl F.:** Galactinol synthase 1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in arabisidopsis.- *Plant Physiology*, **136**: 3148-3158, 2004
- Pazur J. H., Cepure A., Kleppe K.:** Metabolism of oligosaccharides in germinating soybean, glycine max.- *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **99**: 78-85, 1962
- Peterbauer T., Richter A.:** Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stychyose synthase.- *Plant Physiology*, **117**: 165-172, 1998
- Peterbauer T., Puschenreiter M., Richter A.:** Metabolism of galactosylononitol in seedsof *Vigna umbellata*.- *Plant and Cell Physiology*, **39**: 334-341, 1998
- Peterbauer T., Mucha J., Mayer U., Popp M., Glössl J., Richter A.:** Stachyose synthesis in seeds of adzuki bean (*Vigna angularis*): molecular cloning and functional expression of stachyose synthase.- *The Plant Journal*, **20**: 509-518, 1999
- Peterbauer T., Richter A.:** Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds.- *Seed Science Research*, **11**: 185-197, 2001
- Peterbauer T., Lahuta L. B., Blöchl A., Mucha J., Jones D. A., Hedley C. L., Görecki R. J., Richter A.:** Analysis of the Raffinose Family Oligosaccharide Pathway in Pea Seeds with contrasting Carbohydrate Composition.- *Plant Physiology*, **127**: 1764-1772, 2001
- Peterbauer T., Mach L., Mucha J., Richter A.:** Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analyses of raffinose synthesis.- *Planta*, **215**: 839-846, 2002a
- Peterbauer T., Mucha J., Mach L., Richter A.:** Chain Elongation of Raffinose in Pea Seeds (Isolation, Characterization, and molecular cloning of a multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose).-*The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 194-200, 2002b
- Peterbauer T., Karner U., Mucha J., Mach L., Jones D. A. Hedley C. L., Richter A.:** Enzymatic control of the accumulation of verbascose in pea seeds.- *Plant Cell and Environment*, **26**: 1385-1391, 2003
- Peters S., Mundree S. G., Thompson J. A., Farrant J. M., Keller F.:** Protection mechanism in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and Raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit.- *Journal of Experimental Botany*, **58**: 1947-1956, 2007

- Pollock C. J., Kingston-Smith A. H.:** The vacuole and carbohydrate metabolism.- *Adv. Bot. Res.*, **25**: 195-215, 1997
- Pond S.H., von Aderkas P., Bonga J. M.:** Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation).- *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, **38**: 334-341, 2002
- Pond S. P.:** The effect of temperature on conversion of white spruce somatic embryos.- *Propagation of Ornamental Plants*, **5**: 35-44, 2005
- Prodanović O., Prodanović R., Bogdanović J., Mitrović A., Milosavić N., Radotić K.:** Antioxidative enzymes during germination of two lines of serbian spruce [*Picea omorika* (Panč.) Purkyně].- *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, **59**: 209-216, 2007
- Pukacka S., Ratajczak E.:** Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*.- *Functional plant biology*, **34**: 601-613, 2007
- Pullman G. S., Gupta P. K.:** US patent 5034326: Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using absorbent materials in the development stage media- 1991
<http://www.patentstorm.us/patents/5034326/fulltext.html>
- Pullman G. S., Johnson S., Peter G., Cairney J., Xu N.:** Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression.- *Plant Cell Reports*, **21**: 747-758, 2003
- Pullman G. S., Gupta P. K., Timmis R., Carpenter C., Kreitinger M., Welty E.:** Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon.- *Plant Cell Reports*, **24**: 271-279, 2005
- Pullman G. S., Buchanan M.:** Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryos and female gametophyte tissues.- *Tree Physiology*, **28**: 985-996, 2008
- Ramarosandratana A., Harvengt L., Bouvet A., Calvayrac R., Paques M.:** Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos.- *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, **37**: 29-34, 2001
- Reid D. A., Lott J. N. A., Atree S. M., Fowke L. C.:** Imbibition of white spruce seeds and somatic embryos: A study of morphological changes in an environmental scanning electron microscope and potassium leakage.- *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, **35**: 303-308, 1999
- Reisdorph N. A., Koster K. L.:** Progressive loss of desiccation tolerance in germinating pea (*Pisum sativum*) seeds.- *Physiologia Plantarum*, **105**: 266-271, 1999
- Richter A., Peterbauer T., Brereton I.:** The role of stachyose synthase in the oligosaccharide metabolism of legume seeds. Pp.75-84 in Black M., Bradford K.J., Vázquez-Ramos J., (Eds) *Seed biology. Advances and applications*. Wallingford, UK, CAB International- citováno dle: **Peterbauer T., Richter A.:** Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds.- *Seed Science Research*, **11**: 185-197, 2001
- Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T.:** 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, 1990
- Roberts D. R.:** Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. - *Physiologia Plantarum*, **83**: 247-254, 1991a
- Roberts D. R., Lazaroff W. R., Webster F. B.:** Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos.- *Journal of Plant Physiology*, **138**: 1-6, 1991b

- Ruaud J-N., Bercetche J., Paques M.:** First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year old *Picea abies* plants.- *Plant Cell Reports* **11**: 563-566; 1992
- Rumyantseva N. I.:** Arabinogalactan proteins: Involvement in plant growth and morphogenesis.-*Biochemistry-Moscow*, **70**: 1073-1085, 2005
- Salajová T., Salaj J., Kormuťák A.:** Initiation of embryogenic tissue and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. – *Plant Science*, **145**: 33-40, 1999
- Salaj T., Matúšová R., Salaj J.:** The effect of carbohydrates and polyethylene glycol on somatic embryo maturation in hybrid fir *Abies alba* x *Abies numidica*.- *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **46**: 159-167, 2004
- Saravitz D. M., Pharr D. M., Carter T.E.:** Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of 4 soybean genotypes.- *Plant Physiology*, **83**: 185-189, 1987
- Sasaki L., Loewus F. A.:** Metabolism of myo-inositol-2-H-3 and scyllo-inositol-R-H-3 in ripening wheat kernels.- *Plant Physiology*, **66**: 740-745, 1980
- Sauter J. J., van Cleeve B.:** Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation.- *Journal of Plant Physiology*, **139**: 19-26, 1991
- Senaratna T., McKersie B. D.:** Characterization of Soluble Efflux from Dehydration Injured Soybean (*Glycine max* L. Merr) Seeds.- *Plant Physiology*, **72**: 911-914, 1983
- Senser M., Kandler O.:** Galactinol a galactosyldonor in biosynthesis of sugars of raffinose family in leaves.- *Phytochemistry*, **6**: 1533-1537, 1967
- Schuller A., Reuther G.:** Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. – *Plant Cell Report*, **12**: 199-202, 1993
- Scott P., Lyne R. L., ap Rees T.:** Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) . – *Planta*, **197**: 435-441, 1995
- Schuller A., Kirschner-Neß R., Reuther G.:** Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **60**: 23-31, 2000
- Showalter A. M.:** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and funvntion, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 1399-141, 2001
- Silveira V., Balbuena T. S., Santa-Catarina C., Floh E. I. S., Guerra M. P., Handro W.:** Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L.- *Plant Growth Regulation*, **44**: 147-156, 2004
- Skala O.:** Somatická embryogeneze jehličnanů: vliv sacharidů.- *Bakalářská práce, PFF UK*; 2006
- Skriver K., Mundy J.:** Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress.- *Plant Cell*, **2**: 503-512, 1990
- Sprenger N., Keller F.:** Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases.- *The Plant Journal*, **21**: 249-258, 2000
- Sun W. Q.:** Glassy state and seed storage stability: The WLF kinetics of seed viability loss at T>T-g and the plasticization effect of water on storage stability.- *Annals of Botany*, **79**: 291-297, 1997
- Stachelin C., Granado J., Muller J., Wiemken A., Mellor R. B., Felix G., Regenass M., Broughton W. J., Boller T.:** Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases.- *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 2196-2200, 1994

- Stasolla C., Kong L., Yeung E. C., Thorpe T. A.:** Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. – *In Vitro Plant, Cellular and Developmental Biology - Plant*, **38**: 93-105, 2002
- Steiner N., do Nascimento Vieira F., Maldonado S., Guerra M. P.:** Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. – *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**: 895-903, 2005
- Stone S.L., Gifford D.J.:** Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. I. Storage protein reserves. – *Int. J. Plant Sci.*, **158**: 727-737, 1997
- Stone S.L., Gifford D.J.:** Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. II. Storage triacylglycerols and carbohydrates. – *Int. J. Plant Sci.*, **160**: 663-671, 1999
- Sturm A.:** Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. – *Plant Physiology*, **121**: 1-7, 1999
- Sturm A., Tang G-Q.:** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. – *Trends in Plant Science*, **4**: 401-407, 1999
- Svobodová H., Albrechtová J., Kumštýřová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z.:** 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, 1999
- Taber P., Zhang C., Wei-Shou Hu:** Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. – *Canadian Journal of Botany*, **76**: 5, 863-871, 1998
- Taniguchi T., Kurita M., Itahana N., Kondo T.:** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. Et Zucc.), *Plant Cell Reports*, **23**: 26-31, 2004
- Tanner W., Kandler O.:** Myo-inositol, a Cofactor in the Biosynthesis of Stachyose. – *European Journal of Biochemistry*, **4**: 233-239, 1968
- Tapernoux-Lüthi E. M., Bohm A., Keller F.:** Cloning, functional expression, and characterization of the raffinose oligosaccharides chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase, from common bugle leaves. – *Plant Physiology*, **134**: 1377-1387, 2004
- Tapernoux-Lüthi E. M., Schneider T., Keller F.:** The C-terminal sequence from common bugle leaf galactan:galactan galactosyltransferase is a non-sequence-specific vacuolar sorting determinant. – *FEBS Letters*, **581**: 1811-1818, 2007
- Terskikh V. V., Fuertado J. A., Ren C., Abrams S. R., Kermode A. R.:** Water uptake and oil distribution during imbibition of seeds of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) monitored in vivo using magnetic resonance imaging. – *Planta*, **221**: 17-27, 2005
- Thompson R. G., von Aderkas P.:** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. – *Plant Cell Reports*, **11**: 379-385, 1992
- Thornton J. M., Powell A. A., Matthews S.:** Investigation of the relationship between seed leachate conductivity and the germination of Brassica seed. – *Annals of Applied Biology*, **117**: 129-135, 1990
- Tommasi F., Paciola C., Cocetta de Pinto M., De Gara L. A.:** Comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. – *J. Exp. Bot.*, **52**: 1647-1654, 2001
- Tremblay L., Tremblay F.:** Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S. P.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg.) somatic embryos. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **27**: 95-103, 1991

- Tremblay L., Tremblay F. M.:** Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **42**: 39-46; 1995
- Ueda T., Coseoa M. P., Harrell T. J.:** A multifunctional galactinol synthase catalyzes the synthesis of fagopyritol A1 and fagopyritol B1 in buckwheat seed.- *Plant Science*, **168**: 681-690, 2005
- Ulrychová A.:** Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): optimalizace podmínek.- Diplomová práce, PFF UK, 2004
- van Hengel A. J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A., de Vries S. C.:** N-acetylglukosamine and glukosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis.- *Plant Physiology*, **125**: 1880-1890, 2001
- van Hengel A. J., van Kammen A., de Vries S. C.:** A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis.- *Physiologia Plantarum*, **114**: 637-644, 2002
- Vidal-Valverde C., Sierra J. F. I., Lambein I. B. F., Kuo Y-H.:** New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas.- *Eur. Food Res. Technol.*, **215**: 472-477, 2002
- Von Aderkas P., Kong L., Hawkins B., Rohr R.:** Effects of non-freezing low temperatures on quality and cold tolerance of mature somatic embryos of interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss x *P. engelmannii* Parry Ex. *Engelm.*).-*Propagation of ornamental plants*, **7**: 112-121, 2007
- Von Arnold S., Hakman I.:** Regulation of Somatic Embryo Development in *Picea abies* by Abscisic Acid (ABA).- *Journal of Plant Physiology*, **132**: 164-169, 1988
- Vooková B., Gajdošová A., Matúšová R.:** Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids.- *Biologia Plantarum*, **40**: 523-530, 1998
- Walters C., Pammenter N. W., Berjak P., Crane J.:** Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds.- *Seed Science Research*, **11**: 135-148: 2001
- Williams R. J., Leopold A.C.:** The glassy state in corn embryos. – *Plant Physiology*, **89**: 977-981, 1989
- Wise M. J., Tunnaciffe A.:** Popp the question: what do LEA proteins do? - *Trends in Plant Science*, **9**: 13-17, 2004
- Wiweger M., Farbos L., Ingouff M., Lagercrantz U., von Arnold.:** Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperms and angiosperm class IV chitinases.- *Journal of experimental botany*, **54**: 2691-2699, 2003
- Wolkers W. F., Oldenof H., Tablin F., Crowe J. H.:** Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate.- *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **2004**: 125-134, 2004
- Xiao L., Koster K. L.:** Desiccation tolerance of protoplast isolated from pea embryos.- *Journal of Experimental Botany*, **52**: 2105-2114, 2001
- Xiong L., Zhu J. K.:** Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress.- *Plant Cell and Environment*, **25**: 131-139, 2002
- Yamamoto R., Inouhe M., Masuda Y.:** Galactose inhibition of auxin-induced growth of mono- and dicotyledonous plants.- *Plant Physiology*, **86**: 1223-1227, 1988
- Zuther E., Buchel K; Hundertmark M.:** The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*.- *Febs letters*, **576**: 169-173, 2004