

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN



**Strukturální studie proliferační fáze somatické
embryogeneze smrku ztepilého pod vlivem
aromatických cytokininů**

(diplomová práce)

Bc. Marie Kadlecová

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze)

Konzultanti diplomové práce:

Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze)

RNDr. Hana Konrádová, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze)

RNDr. Jana Malá, CSc. (Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti v Jílovišti – Strnadlech)

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Prof. Jany Albrechtové, doc. Heleny Lipavské, Dr. Hany Konrádové a Dr. Jany Malé.

V Praze dne

Marie Kadlecová

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a především její neuvěřitelně přátelský přístup během psaní práce. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. za její trpělivost a ochotu mi vždy s čímkoliv poradit. Déle děkuji také Doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. a RNDr. Janě Malé, CSc. za přínosné rady a neposlední řadě patří také díky Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D., Mgr. Zuzaně Kubínové, Mgr. Drahomíře Bartákové a Mgr. Lence Hruškové. Dr. Jiřímu Janáčkovi z Fyziologického ústavu AV ČR děkuji za konzultace statistického hodnocení. Velké poděkování patří také mým nejbližším, kteří mi hlavně v závěru práce byli oporou a měli se mnou stále dostatek trpělivosti.

Práce byla vypracována v letech 2010 – 2013 na Katedře experimentální biologie rostlin a je součástí grantu GAUK 43-253218.

Seznam použitých zkratek

2,4-D	2,4-dichlorphenoxyoctová kyselina
2iP	2-isopenthenyladenine
ABA	kyselina abscisová
BA	benzyladenin
BAP	benzylaminopurin
(9R)BA	benzyladenin-9-ribosa
IAA	kyselina indol-3-acetová
KIN	kinetin
Lat B	Latrunkulin B
NAA	kyselina naftalen-octová
MemT	<i>meta</i> -methoxytopolin
MemTR	<i>meta</i> -methoxytopolin ribosid
MemTTHP	<i>meta</i> -Methoxy topolin
MeoT	<i>ortho</i> -methoxytopolin
MeoTR	<i>ortho</i> -methoxytopolin ribosid
MeOBAP	6-(3-methoxybenzylamino)purine
<i>m</i> T	meta-topolin = 6-(3-hydroxybenzylamino)purin
<i>m</i> TR	meta-topolin ribosa
PEG	polyethylenglycol
PEM	proembryonální masa
TDZ	thidiazuron
Z	zeatin

OBSAH

1. ABSTRAKT	7
2. ABSTRACT	9
3. ÚVOD	11
4. TESTOVANÉ HYPOTÉZY	12
5. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	12
6. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
6.1. SOMATICKÁ EMBRYOGENEZE U JEHLIČNANŮ	13
6.2. INDUKCE	16
6.2.1. Používané explantáty.....	16
6.2.2. Indukční médium.....	16
6.2.3. Strukturální popis vzniku embryí.....	17
6.2.4. Linie <i>Picea abies</i> s různým embryogenním potenciálem	18
6.3. PROLIFERACE.....	19
6.3.1. Proliferační médium a podmínky kultivace	19
6.3.2. Zmražení kultury (kryoprezervace).....	21
6.3.3. Strukturální popis proliferační fáze.....	21
6.3.4. Programovaná buněčná smrt v procesu SE.....	23
6.4. AROMATICKÉ CYTOKININY	24
6.4.1. Cytokininy.....	24
6.4.2. Vliv topolinů na množení rostlin <i>in vitro</i>	26
6.4.3. Vliv topolinů na zakořeňování a aklimatizování rostlin <i>ex vitro</i>	27
6.4.4. Pozitivní vlivy topolinů na snižování abnormalit vyskytujících se u rostlin během jejich kultivace <i>in vitro</i>	29
6.4.5. Jaké poznatky byly o aromatických cytokininech doposud popsány u jehličnanů?.....	32
7. MATERIÁL A METODY	34
7.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL	34
7.2. KULTIVAČNÍ POSTUP	34
7.2.1. Složení kultivačního média a kultivace.....	34
7.3. METODY	36
7.3.1. Odběr vzorků	36
7.3.2. Příprava trvalých preparátů.....	37
7.3.3. Kvantitativní analýza struktur	38
8. VÝSLEDKY	44
8.1. KVANTITATIVNÍ PARAMETRIZACE MERISTEMATICKÉ ČÁSTI.....	44
8.2. STANOVENÉ STRUKTURÁLNÍ KATEGORIE	45
8.2.1. Pravidelné somatické embryo = kvalitní rané somatické embryo	45
8.2.2. Živá meristematická hmota.....	48
8.2.3. Polyembryonie.....	49
8.2.4. Degenerující meristematická struktura	50
8.2.5. Suspenzorové buňky.....	52
8.2.6. Mrtvé suspenzorové buňky.....	52
8.3. HODNOCENÍ POMĚRNÉHO ZASTOUPENÍ EMBRYOGENNÍCH STRUKTUR	54
8.3.1. Kultura 107.....	54
8.3.2. Kultura 34C.....	59
8.3.3. Porovnání kultur 107 a 34C	62
8.3.5. Porovnání kultur 107, 34C a AFO 541 u varianty BAP	66
9. DISKUSE	70
10. SHRUTÍ	82
11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84

1. ABSTRAKT

Somatická embryogeneze (SE) představuje potenciačně velmi vhodný způsob množení – mikropropagace - rostlin *in vitro*. Tento proces je zkoumán již přes třicet let, za tuto dobu bylo získáno v oboru velmi mnoho znalostí, nicméně stále ještě jsou hledány cesty k zdokonalení a zefektivnění procesu kultivačních protokolů na základě nových poznatků.

Poměrně nedávné objevení aromatických cytokininů vedlo k novým poznatkům, že u různých rostlinných druhů vykazují velmi pozitivní vlivy na různé morfogenetické a fyziologické procesy jednak při kultivaci *in vitro*, tak i při ošetření *in vivo*. To se stalo podnětem pro téma této práce, která byla zaměřena na prozkoumání vlivu meta-topolinu (*mT*), aromatického cytokininu, na průběh proliferační fáze SE na strukturální úrovni u embryogenních linií smrku ztepilého *Picea abies* (L.) Karst.

Cílem práce byla analýza strukturálního vývoje embryogenních kultur s použitím anatomických preparátů a kvantitativních stereologických metod. Použitý materiál představovaly tři embryogenní linie: 107 a 34C byly získány z VÚLHM od Dr. Jany Malé, a kultura AFO 541, která byla použita jako standard. Pro porovnání vlivu cytokininu *mT* s benzylaminopurinem (BAP) na poměrné zastoupení jednotlivých embryogenních struktur v kultuře se vyskytujících, bylo nadefinováno několik strukturálních kategorií, z nichž nejdůležitější pro další fáze SE představují kvalitní raná somatická embrya, která jsou posléze schopná úspěšně se vyvíjet v průběhu maturace.

Předpokládané pozitivní účinky *mT* na embryonálně suspenzorovou hmotu se potvrdily u linie 34C. U linie 107 si varianta BAP u všech provedených odběrů vedla lépe v poměrném zastoupení živých meristematických struktur. V porovnání embryogenního potenciálu jednotlivých linií bylo zjištěno, že kultura 107 a AFO 541 jsou více embryogenní než linie 34C. Kultura 34C vykazovala velký podíl degenerovaných meristematických struktur. Polyembryonie se u této kultury vůbec nevyskytovala narozdíl od linií 107 a AFO 541.

Diplomová práce poskytuje zcela originální výsledky kvantitativního hodnocení výskytu různě embryogenních struktur s použitím stereologických metod a systematického rovnoměrně náhodného vzorkování, která zaručují nevychýlenost odhadů měřených kvantitativních parametrů. Poznatky z DP mohou být využity pro vytypování linií s kvalitním embryogenním potenciálem a případnému zdokonalení kultivačních protokolů proliferační fáze somatické embryogeneze smrku ztepilého.

KLÍČOVÁ SLOVA

Somatická embryogeneze, proliferace, smrk ztepilý, aromatické cytokininy, meta-topolin, benzylaminopurin, AFO 541, embryogenní potenciál

2. ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) represents potentially very suitable way of plant production – micropropagation – of plants *in vitro*. The process had been studied for more than thirty years and a lot of knowledge has been gained in the field though new ways based on new knowledge leading to improvement and increase of the effectiveness of cultivation protocols are still under focus in the field.

Relatively recent discovery of aromatic cytokinins lead to new knowledge on very positive effects on different morphogenetic and physiological processes during both cultivation *in vitro* or *in vivo* treatments. This gave origin to the topic of the present thesis, which focused on study of the effect of meta-topolin (*mT*), aromatic cytokinin, on proliferation phase of SE on structural level of embryogenic lines of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst.

The aim of the thesis is analysis of structural development of embryogenic lines with the use of anatomical preparations and quantitative stereological methods. The material represented three embryogenic lines: 107 and 34C were obtained from the Forestry and Game Management Research Institute from the lab of Dr. Jana Malá and the line AFO 541, which was used as a standard line. To compare the effect of *mT* with benzylaminopurine (BAP) on proportion of different embryogenic structures in a culture, several structural categories was defined. The most important one for further embryo development is a category of early somatic embryo, which can successfully continue in development during following phases of SE starting with maturation.

Expected positive effects of *mT* on embryonal suspensor mass were proved for the line 34C. For the line 107 this was not verified, the line 107 cultivated under BAP exhibited higher proportion of early somatic embryos in all sampling dates. When comparing embryogenic potential of all lines tested, it was found out that lines 107 and AFO 541 exhibited better embryogenic potential than the line 34C. The line 34C contained a higher proportion of degenerated meristematic structures. Polyembryony has not been found in the line 34C at all comparing to both remaining 107 and AFO 541.

The presented Mgr. Thesis brings original results of quantitative evaluation of occurrence of different embryogenic structures with use of stereological methods and systematic uniform random sampling yielding unbiasedness of estimations of parameters under study. The results of the Thesis may be used for selection of lines with good quality

embryogenic potential and for the potential improvement of cultivation protocols of proliferation phase of somatic embryogenesis of Norway spruce.

KEY WORDS

Somatic embryogenesis, proliferation, Norway spruce, aromatic cytokinins, meta-topoline, benzylaminopurine, AFO 541, embryogenic potential

3. ÚVOD

Somatickou embryogenezí je nazýván proces, při kterém se z tělních, neboli somatických, buněk vytváří embrya, která jsou posléze schopná dát vzniku mladé rostlině. Tento proces je zkoumán již více než třicet let, za tuto dobu bylo zjištěno mnoho důležitých informací. Ovšem stále jsou v průběhu kultivace mezery, které je nutné zaplnit, než bude možné plně tuto metodu využívat v praxi a nové poznatky v oboru tyto mezery postupně pomáhají vyplňovat.

Somatická embryogeneze by mohla být v první řadě velmi levným nástrojem kultivace *in vitro*, jako další využití se jeví zachování vzácných genotypů, produkce vánočních stromků či využití pro papírenský průmysl. Somatická embryogeneze také velmi dobře slouží jako studijní materiál vývoje rostlin.

Celý proces somatické embryogeneze je rozdělen na několik po sobě jdoucích fází: indukce, proliferace, maturace, desikace a přeměna v mladou rostlinu. V každém tomto kroku vyžaduje pěstovaná kultura přesné dodržení kultivačního protokolu, právě toto bylo předmětem mnoha dosavadních studií. Složení kultivačního média se v jednotlivých fázích mění, např. v indukci jsou hlavními složky auxiny a cytikininy, naopak v maturaci je majoritní složkou kyselina abscisová.

V mé diplomové práci se zabývám vlivem aromatických cytokininů na vývoj somatických embryí a jejich anatomickou stavbu, konkrétně v proliferační fázi, kdy jsou cytokininy hlavní součástí kultivačního média. Aromatické cytokininy se jeví jako velký příslib ke zlepšení kvality stavby somatických embryí (Malá a kol. 2009). Ovšem detailnější anatomická studie zabývající se tímto problémem dosud chybí. Dle mých znalostí neexistuje práce, která by kvantitativně hodnotila proliferační fázi somatické embryogeneze.

Použitým materiálem pro mou práci je smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.), který je velmi významným druhem dřevin severní a střední Evropy. Konkrétně v ČR tvoří zhruba 50 % celkové plochy všech lesů.

Svojí diplomovou prací navazuji na úspěšně publikované práce Katedrou experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze (Kumštýřová, 1999, Gosslová, 2000, Svobodová, 2001). Tyto práce byly také vypracovány na somatické embryogenezi smrku ztepilého.

4. TESTOVANÉ HYPOTÉZY

H1: Kultury rostoucí na médiu s přídavkem *mT* budou prospívat mnohem lépe než varianta ošetřená pomocí BAP.

H2: Kultury rostoucí na médiu s přídavkem *mT* budou mít větší poměrné zastoupení meristemických struktur, především raných somatických embryí, případně polyembryonie než varianta ošetřená pomocí BAP.

H3: Studované kultury 107, 34C a AFO 541 budou vykazovat obdobný strukturální vývoj odpovídající vysoce embryogenním liniím.

5. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíl 1: příprava metodiky kvantitativního hodnocení strukturálního vývoje proliferační fáze somatické embryogeneze smrku ztepilého s použitím stereologických metod a analýzy obrazu

Cíl 2: definice sledovaných kategorií embryogenních struktur pro hodnocení strukturálního vývoje embryogenních kultur

Cíl 3: hodnocení poměrného zastoupení embryogenních struktur

Cíl 4: vyhodnocení embryogenního potenciálu studovaných embryogenních kultur

6. LITERÁRNÍ PŘEHLED

6.1. Somatická embryogeneze u jehličnanů

Somatická embryogeneze je proces, při kterém dochází k formování embryí ze somatických (neboli tělních) buněk. Nejprve se během tohoto procesu vytváří striktně bipolární struktura, která následně prochází dalšími fázemi – formováním časného (raného) somatického embrya, zráním (maturací), případně také desikací (fází vysoušení). Vývoj somatického embrya dále může pokračovat klíčením a konečně přeměnou v mladou životaschopnou rostlinu.

Praktické využití u jehličnanů se v současnosti nachází při množení vánočních stromků nebo pro pěstování stromů s optimálními vlastnostmi dřeva, například pro papírenský průmysl, či jako nástroj pro zachování genotypů vzácných druhů. Metoda ale stále ještě není rutinně použitelná pro široké množství druhů a genotypů (především díky nutnosti optimalizace protokolu pro jednotlivé druhy/linie jehličnanů), stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek.

Somatická embryogeneze je u jehličnanů zkoumána již přes třicet let, první popisy struktur somatických embryí byly provedeny nezávisle na sobě několika týmy, ale u žádných embryí nebyl pozorován následný vývoj (Durzan a Chalupa, 1976, Durzan, 1980). O několik let později se již podařilo odvodit a kultivovat embrya, která byla schopná dát vzniknout životaschopným rostlinám (Chalupa, 1985; Hakman a kol., 1985).

Celý proces somatické embryogeneze je ovlivněn mnohými faktory, jimiž jsou především složení kultivačního média, výběr a stáří výchozího explantátu či použitý genotyp.

Fáze somatické embryogeneze:

- Indukce embryogenní kultury – somatická buňka získává podobné vlastnosti jaké má zygota (podrobněji kap. 6.2).
- Proliferace, neboli udržování/množení kultur somatických embryí (podrobněji kap. 6.3).
- Maturace (= zrání somatických embryí)

Maturace, neboli zrání somatických embryí nastává jejich přenesením na maturační médium, které již neobsahuje auxiny a cytokininy (součást indukčního a proliferačního média) a na místo toho obsahuje kyselinu abscisovou (ABA) (Gutman a kol., 1996, Bozhkov a kol., 2002). Nepostradatelnou součástí médií jsou také sacharidy, jejichž typ a koncentrace

má na průběh somatické embryogeneze výrazný vliv (např. Lipavská a Konrádová, 2004). Významný vliv na průběh maturace má také přidání nepenetrujícího osmotika (polyethylenglykol, PEG) (např. Find, 1997, Svobodová a kol., 1999). Nově se také ukázalo, že vhodná dávka latrunkulinu B zlepšuje vývoj embryí, ponechává embrya, která ve vývoji nejsou opožděna, dochází tak k selekci kvalitních somatických embryí (Havelková, 2010, Schwarzerová a kol., 2010).

Během maturační fáze embryo projde postupně několika vývojovými stádii. Na maturační médium se přenášejí embrya ve stádiu rané somatické embryo (charakteristika viz kap. 6.3.3), tato embrya mají typicky bipolární charakter, který si ponechávají i v dalších vývojových fázích, jakými jsou: cylindrické embryo, prekotyledonární embryo a kotyledonární embryo (obr. 6.1.1 a 6.1.2) (Svobodová a kol., 1999, Hakman a von Arnold, 1988).

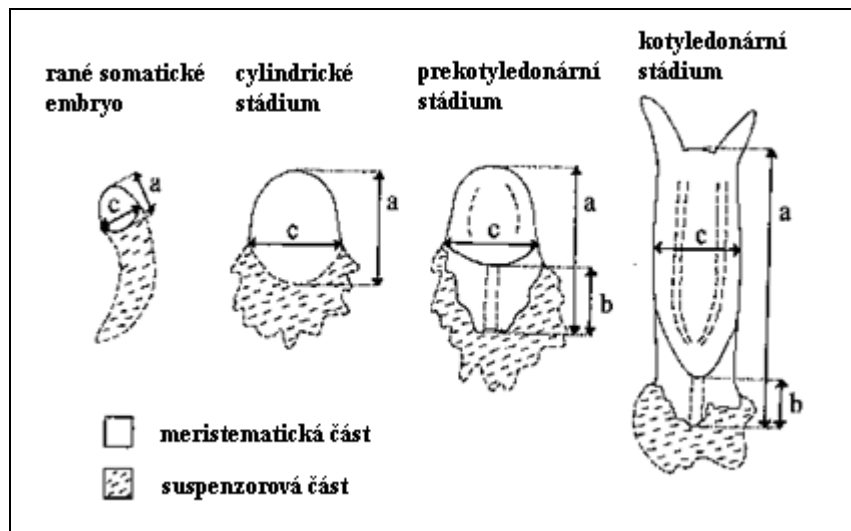
- Desikace

Desikace je fáze částečného vysušování, která je vyžadována u mnoha genotypů k tomu, aby plně vyvinutá somatická embrya mohla úspěšně vyklíčit a následně se přeměnit v životaschopnou rostlinu. Ztráta vody je přirozená událost, při níž dosahují embrya fyziologické zralosti a zároveň probíhají změny v buněčném metabolismu (Finer a kol., 1989). U druhu *P. abies* se považuje jako optimální délka této periody 4 týdny (Find, 1997) v podmínkách vysoké vzdušné vlhkosti.

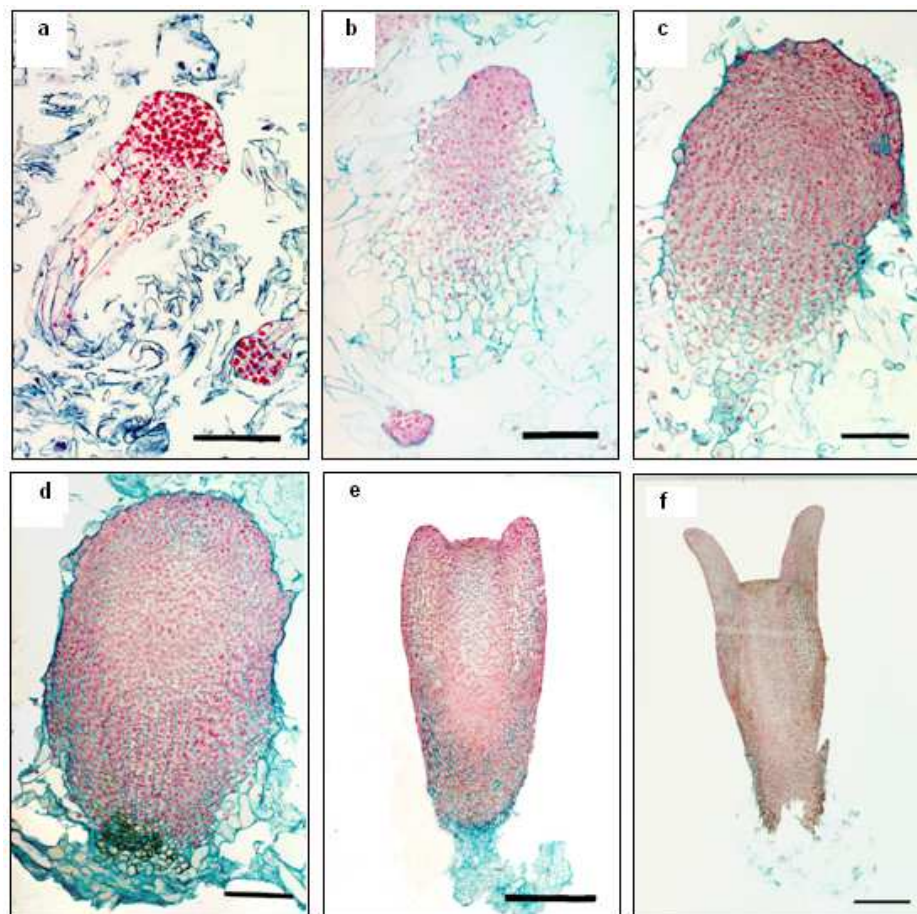
- Klíčení a přeměna v mladou rostlinu

Pro klíčení se běžně používá médium bez růstových regulátorů. Během této fáze dochází k dalšímu vývoji kořenového pólu a nadzemních částí rostliny, která se tak stává postupně plně autotrofní. Ovšem poměrně často dochází k narušení vývoje kořenového pólu (Find, 1997, Lelu a Label, 1994). Nyní se ukazuje, že aromatické cytokininy (topoliny) by mohly tyto problémy vyřešit, u mnoha druhů rostlin bylo pozorováno pozitivní ovlivnění těchto abnormalit (např. Werbrouck a kol., 1996, Malá a kol., 2009).

Práce je zaměřená na indukční a proliferační fázi somatické embryogeneze, proto již dále fáze maturace, desikace a klíčení nejsou popisovány, předchozí odstavce slouží pouze k základní orientaci čtenáře o těchto fázích. V následujícím textu jsou podrobně popsány fáze indukce a proliferace u druhů *Picea* a především u *P. abies*, na kterém byla prováděna experimentální část diplomové práce.



Obr. 6.1.1: Jednotlivá vývojová stádia somatických embryí. a – c označují kvantitativní charakteristiky pozorované u somatických embryí (a – výška apikálního meristému, b – délka kořenové čepičky, c – šířka embrya). Převzato ze Svobodová a kol. (1999).



Obr. 6.1.2: Somatická embrya *P. abies* v maturační fázi. **a** Rané somatické embryo, 1. týden kultivace. **b** Cylindrické embryo, 2. týden kultivace. **c** Prekotyledonární embryo, 3. týden kultivace. Viditelná diferenciacie kořenové čepičky a kolumelly. **d** Prekotyledonární embryo, 4. týden kultivace. Kořenová čepička je již utvořena. **e** Kotyledonární embryo, 5. týden kultivace. Pozorovatelné formování a růst děloh. **f** Kotyledonární embryo, 6. týden kultivace. Kořenová čepička se začala rozpadat. Úsečka v obrázcích odpovídá a-d, 200 µm, e-f 500 µm. Převzato ze Svobodová a kol. (1999).

6.2. Indukce

6.2.1. Používané explantáty

Přímá závislost existuje mezi výběrem použitého explantátu a úspěchem následné indukce. U jehličnanů se využívají především juvenilní pletiva, kterými jsou nezralá či zrající zygotická embrya. Ve studii Stasolla a kol. (2002a) je uveden přehledný seznam s výčtem všech druhů jehličnanů, u nichž byla somatická embryogeneze již zkoumána, a k nim jsou přiřazeny jejich vhodné výchozí explantáty.

Obecně lze říci, že platí pravidlo, čím starší je použitý explantát, tím menší je pravděpodobnost úspěšné indukce (von Arnold a kol., 1995). Nejběžněji jsou využívána nezralá embrya v prekotyledonárním stádiu či zralá embrya v kotyledonárním stádiu (Stasolla a kol., 2002a). U některých druhů smrků byla úspěšnost vyšší, pokud byly použity k získání embryogenní kultury zralá zygotická embrya (Hazubská-Przybyl a Bojarczuk, 2008). U kultury druhu *P. abies* se diferencovalo celkem 39 % explantátů izolovaných ze zygotických embryí do embryogenních struktur, ale pouze 10-15 % mohlo být následně izolováno a subkultivováno. Toto procento bylo stejné jak u nově izolovaných embryí, tak u 36 dní staré kultury. Pokud byly embryogenní struktury v kontaktu s médiem, většinou přežily a následně mohly proliferovat, naopak části bez jakéhokoliv kontaktu s médiem většinou vyschly a odumřely (Mo a von Arnold, 1991).

Z hlediska těchto poznatků je zajímavé připomenout linii AFO 541, která je použita v této práci. Je výjimečná tím, že byla odvozena z jehlic 5-ti denních klíčnic rostlinek, a to již v polovině 90. let minulého století (Galerie a kol., 1992; Ruaud a kol., 1992).

6.2.2. Indukční médium

Obecně složení kultivačního média ovlivňuje v každé fázi somatické embryogeneze její úspěšnost. Nezbytnou součástí indukčního média jsou růstové regulátory, jimiž jsou především auxiny a cytokininy, přítomnost těchto regulátorů je konkrétně u druhů *Picea* vždy požadována (Mo a von Arnold, 1991). U jiných druhů tomu tak být nemusí, například u rodu *Pinus*, kde se v závislosti na genotypu někdy využívají pouze auxiny (Becwar a kol., 1990) či u rodu *Abies*, kde se naopak používají typicky pouze cytokininy (Salajova a kol., 1996).

Dalšími faktory ovlivňující průběh indukce jsou pH média, použitá zpevňující složka, množství dusíku či sacharózy (Tautorus a kol., 1991). Obecně jsou využívány dva typy médií,

tekutá a pevná. Pevná média obsahují zpevňující (želírující) složku, např. agar. Další složení obou typů médií je většinou velmi podobné. Běžněji se využívá médium pevné (Vágner a kol., 2005).

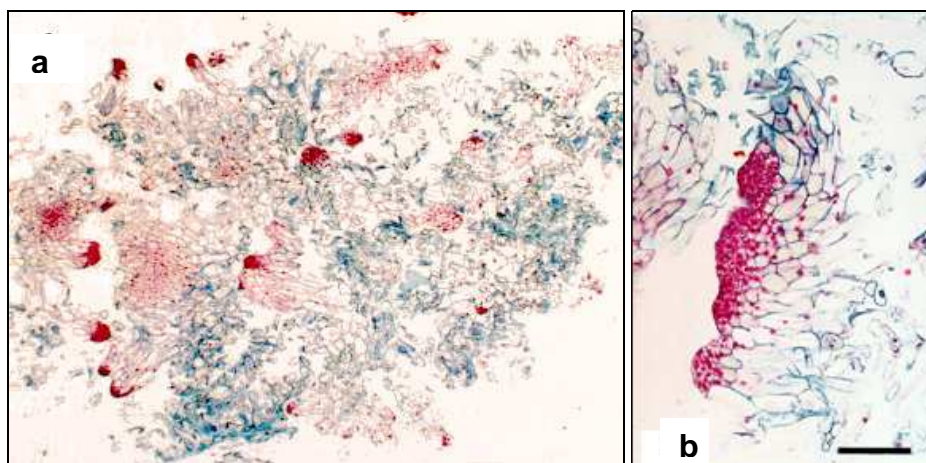
6.2.3. Strukturální popis vzniku embryí

Vlastní vznik embryí probíhá u jehličnanů následujícími způsoby:

1) Vznik somatických embryí probíhá asymetrickým dělením somatické buňky, což definuje budoucí somatické embryo a jeho suspensor. Tímto rozdělením se utváří buňka s velmi hustou cytoplazmou, k níž je připojená buňka vysoce vakuolizovaná, která se označuje jako primární suspensor. Takto utvářená dvojice buněk má bipolární charakter, který si zachovává po celou dobu následného vývoje. Po vytvoření tohoto bipolárního systému, dochází následně k buněčnému dělení buňky s hustou cytoplazmou, díky čemuž vzniká množství podobných buněk se shodnou morfologií. K těmto buňkám je stále v této fázi připojen primární suspensor, který ovšem postupně odumírá. Buňky s hustou cytoplazmou se mezitím neustále dělí, buňky, které jsou uloženy proximálně, se začínají prodlužovat a tím vytvářet nový sekundární suspensor. Toto je jeden ze způsobů, jak vznikají raná somatická embrya (Tautorus a kol., 1991, Hakman a von Arnold, 1988, Jaksik a kol., 1995).

2) Jinou možností, jak mohou vznikat raná somatická embrya, je jejich vznik z malých meristemických buněk, které se nacházejí v suspensoru. Tyto malé meristemické buňky mají svůj původ buď v asymetrickém dělení jedné z buněk suspensoru, či v některé z meristemických buněk, která se náhodně oddělila a zanořila se mezi buňky suspensoru (Tautorus a kol., 1991).

3) Dalším z možných způsobů vzniku somatických embryí je pomocí mechanismu, který se shoduje s procesem štěpná polyembryonie. Tento jev je pozorovaný během vývoje raných zygotických embryí, jedná se o proces vzniku více embryí z jediné zygoty (von Arnold a kol., 2002). U somatické embryogeneze je výsledkem takto vzniklých embryí, komplex několika somatických embryí mající jeden společný suspensor (Hakman a von Arnold, 1988, Jaksik a kol. 1995, Svobodová a kol., 1999).



Obr. 6.2.3.1: Indukce somatických embryí. *P. abies* **a** Embryogenní kultura na proliferačním médiu, patrné jsou okrsky meristematických buněk. **b** Polyembryonie, embryogenní oblast dávající vznik několika embryím. Úsečka v obrázku odpovídá 200 μm . K barvení použita alcianová modř a pravá červeň jádrová. Převzato ze Svobodová a kol. (1999).

6.2.4. Linie *Picea abies* s různým embryogenním potenciálem

Podle schopnosti dále se vyvíjet a zároveň dle morfologie somatických embryí rozdělili Jalonen a von Arnold (1991) embryogenní buněčné linie smrku ztepilého do tří kategorií (skupiny A1, A2 a B). První skupina A1 zahrnovala polarizovaná somatická embrya s velmi dobře definovanou meristematickou oblastí. Do skupiny A2 spadaly somatická embrya radiálně symetrická. Obě tyto skupiny byly schopny následného vývoje. Poslední skupina B obsahovala somatická embrya, která byla vytvářena malými shluky meristematických buněk kolem nichž se nacházely vysoce vakuolizované buňky, tento druh embryí ovšem nebyl nijak schopen dalšího vývoje. Studie Egertsdotter a kol. (1993) zabývající se produkcí extracelulárních proteinů potvrdila toto rozdělení. Klasifikovala buněčné linie dle produkce extracelulárních proteinů, načež se ukázalo, že se toto rozdělení shoduje s předchozím dělením, které bylo vytvořeno na základě vnější morfologie.

Jiná klasifikace byla vytvořena na základě prospívání embryogenních linií *P. abies* na zpevněném či tekutém médiu (Egertsdotter a von Arnold, 1993).

Je tedy zřejmé, že schopnosti produkovat kvalitní somatická embrya se u jednotlivých buněčných linií liší.

6.3. Proliferace

6.3.1. Proliferační médium a podmínky kultivace

Proliferace je fází, která přímo navazuje na fázi indukční, ve které se započalo formování bipolární struktury, embryonálně suspenzorové hmoty. Embryogenní kulturu je možné přenést z indukčního média na médium proliferační (a oddělit od primárního explantátu) po dosažení několikamilimetrového průměru indukované embryonálně suspenzorové hmoty. Doba, po které se tento transfer provádí, se odvíjí od druhu použitého média, u pevného média se přenos provádí zhruba po 10-14 dnech, u médií tekutých jde o interval kratší, zhruba 7 dní (Gupta a Duzan, 1987). Prodlužování této doby není příliš vhodné, a to především u tekutých médií, neboť to zapříčiňuje změny v embryonálním potenciálu příslušné kultury a posléze i k produkci menšího množství embryí (Dunstan a kol., 1993).

Ovšem existují i výjimky, například u druhu *Larix x leptoeuropaea* byla buněčná kultura schopná přenosu na proliferační médium již po dvou dnech, velikostně dosahovala embryonálně suspenzorová hmota pouze 0,15 mm (Gutmann a kol., 1996). U druhu *P. abies* je považováno za vhodnou velikost pro přenos embryonálně suspenzorové hmoty zhruba 8-10 mm (Vágner a kol., 2005).

Kultury pěstované na pevných médiích jsou mnohem více synchronizované (von Arnold a kol., 2002). U tekutých médií je ve srovnání s pevnými pozorován obvykle rychlejší růst. Některé kultury dokonce vykazují lepší růst, pokud jejich kultivaci na médiu pevném předcházela epizoda kultivace na tekutém médiu. Obecně se, ale tekuté médium používá pouze velmi krátký čas a s omezením pouze na proliferační fázi vývoje. Prakticky se využívá tekuté médium pro kultivaci těsně před zmrazením embryogenní kultury (Vágner a kol., 2005).

Složení proliferačního média se od média indukčního příliš neliší, opět jeho důležitou součástí představují růstové regulátory v podobě auxinů a cytokininů. Přítomné auxiny nejčastěji zastupuje kyselina 2,4-dichlorphenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftalen-octová (NAA) (Stasolla a Yeung, 2003). Velmi pozitivní účinky vlivu 2,4-D na anatomii a produkci raných somatických embryí byly popsány na druhu *Abies alba* Mill., kultura pěstovaná na médiu s 2,4-D rostla rychleji a obsahovala velmi četná proembryonální centra, naopak u varianty bez přidání 2,4-D byla embrya velmi drobná a s krátkými suspenzory, rostla

pomalu a celkový počet embryí byl velmi nízký (Vondráková a kol., 2011). Podrobnější popis týkající se cytokininů viz následující podkapitola (kap. 6.4).

Významnou složkou proliferačního média je přidávaný cukr – nejčastěji sacharóza. Koncentrace sacharózy v proliferačním médiu se nachází v rozmezí od 1% sacharózy (von Arnold a kol., 1995) až do 3% (Lipavská a kol., 2000b).

Podmínky kultivace týkající se světelného či teplotního optima nejsou v této fázi obecně definovatelné, vždy jsou odvislé od konkrétního druhu a získaných zkušeností s tímto druhem. Například stálého ozáření $3-5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a teploty $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo využito ke kultivaci *Picea glauca* (Moench) Voss., tato kultura za těchto stanovených podmínek prospívala (Hakman a von Arnold, 1988). Přesto je mnohem častější provádět kultivaci ve tmě, příkladem může být *Pinus nigra* kultivovaný při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Salajová a kol., 1995), či *P. abies* při teplotě $24 \text{ }^\circ\text{C}$ (Svobodová a kol., 1999). Běžně užívaná hodnota pH média pro kultivaci *P. abies* je 5,8 (Vágner a kol., 2005), nicméně se tato hodnota v průběhu subkultivačního intervalu mění. Hodnota endogenního pH v proliferační fázi během subkultivačního intervalu klesá, pohybuje se v rozmezí mezi 5,8 až 4, nižší pH je pro kultury na proliferačním médiu charakteristické (von Arnold a kol., 2002).

Subkultivační interval je časové období, kdy kultura setrvává na médiu, následně je přenesena na médium čerstvé a začíná další subkultivační interval. I délka tohoto intervalu se opět liší, v závislosti na zkoumaném druhu a genotypu, většinou bývá v rozmezí 1-4 týdnů. Jeden měsíc byl interval dlouhý u *P. glauca* (Hakman a von Arnold, 1988). Dva týdny byla doba intervalu použita u *Picea glauca x engelmaii* (Webster a kol., 1990), *P. nigra* (Salajová a kol., 1995) či *Larix x leptoeuropaea* (Gutmann a kol., 1996). U *P. abies* byl použit subkultivační interval jeden týden (Svobodová a kol., 1999).

Opakováním přenosu na proliferačním médiu se stává vzhled a růst kultury *P. abies* po několika týdnech uniformní, takto je možné udržovat buněčnou kulturu po mnoho let (Vágner a kol., 2005).

Ve studii prováděné na druhu *Picea koraiensis* bylo testováno celkem 7 různých genotypových linií na 4 různých proliferačních médiích. Studie ukázala, že úspěšnost proliferace je nejen závislá na správném složení média, ale i na genotypu kultury (Li a kol., 2008).

6.3.2. Zmražení kultury (kryoprezervace)

Proliferační fáze je velmi vhodným okamžikem pro zmražení kultur, tímto způsobem je možné kultury velmi dlouho uchovávat, a po šetrném rozmražení dál používat např. pro další oživení či experimenty (von Arnold a kol., 1995). První úspěšné zmražení embryogenních kultur smrku ztepilého bylo publikováno v roce 1987 (Gupta a kol., 1987).

Různé buněčné linie vykazují rozdílnou toleranci k zamražení. Vágner a kol. (2005) se zaměřili na ošetření zmražením u několika embryogenních linií *P. abies*. Po rozmražení byl růst kultury viditelný po 1-2 týdnech. Meristematické hlavy somatických embryí se začaly od sebe oddělovat, suspenzorová část embryí byla zmražením poškozena, ale opět se zotavila. Není pochyb, že zmražení představuje silný selekční tlak, který může zapříčinit změny v embryogenním potenciálu konkrétní kultury.

6.3.3. Strukturální popis proliferační fáze

Během proliferační fáze je na makroskopické úrovni pozorovatelná embryogenní kultura nedrobivého vzhledu, která má hladký a lesklý povrch (obr. 6.3.3.1ab). Hakman a von Arnold (1988) pozorovali embryonální kulturu průsvitného vzhledu. V jiné práci byla pozorována kultura barvy bělavé či žlutavé (Svobodová a kol., 1999).

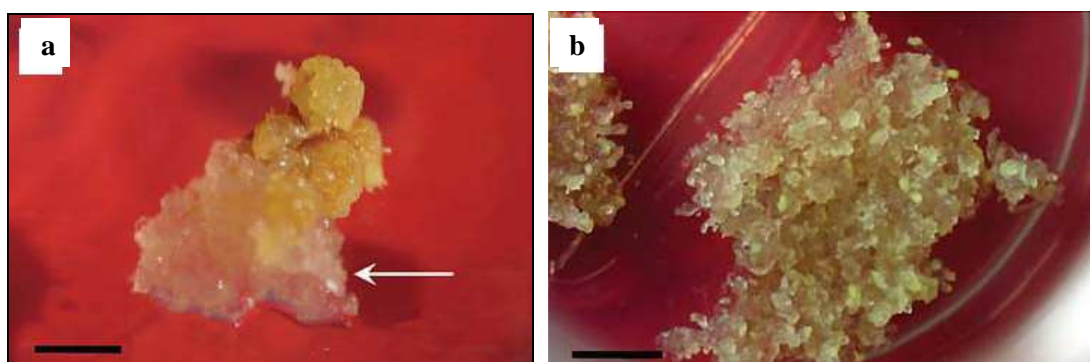
Asymetrický komplex, zahrnující na jedné straně hustě cytoplazmatické meristematické buňky s velkými jádry a na straně druhé buňky dlouhé a vysoce vakuolizované, které tvoří suspenzor, se utváří již v indukční fázi (kap. 6.2.3). Poprvé byla tato struktura popsána u *P. glauca* (obr. 6.3.3.2a) ve studii Hakman a von Arnold (1988). Tato bipolární struktura se nazývá rané somatické embryo (obr. 6.1.2a, 6.3.3.2abc), můžeme ho pozorovat během celé proliferace. Tato raná fáze vývoje je morfologicky velmi podobná raným zygotickým embryím (Svobodová a kol., 1999, von Arnold a kol., 2002).

U raných somatických embryí dochází k histologické diferenciaci, při níž z vnější vrstvy meristematických buněk vzniká protoderm, který se v pozdějším vývoji přetvoří na epidermis (obr. 6.3.3.2b). Zároveň bylo pozorováno, že mitotická aktivita je většinou viditelná v buňkách hlavy embrya, meristematické buňky s hustou cytoplazmou, nikoliv v buňkách suspenzoru (Stastolla a kol., 2002). Hustě cytoplazmatické buňky byly pozorovány mezi buňkami vakuolizovaného suspenzoru velmi sporadicky (Svobodová a kol., 1999). Značná akumulace škrobu byla pozorována v blízkosti suspenzoru u raných somatických embryí (Stastolla a kol., 2002).

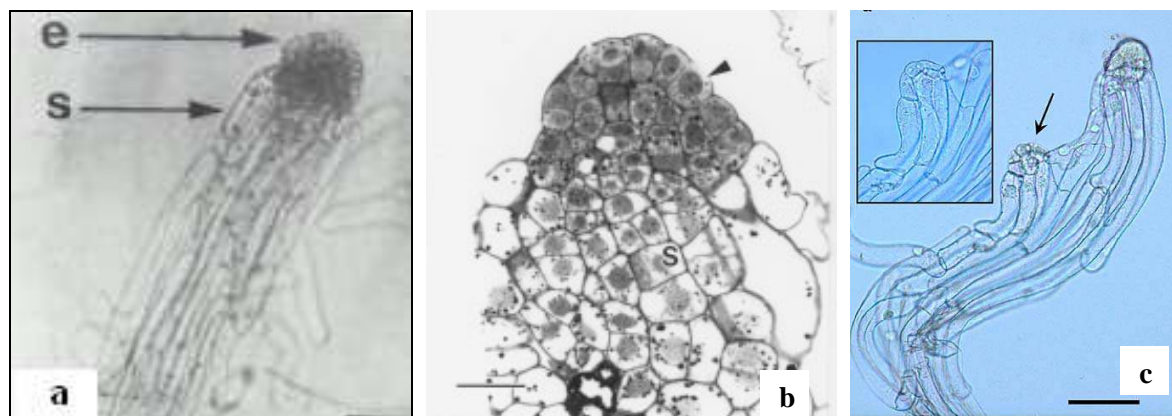
I u dalších druhů jehličnanů mají somatická embrya typický bipolární charakter, ovšem například u borovic se liší výrazně delšími suspensory. U *Pinus pinea* L. byly pozorovány velmi dlouhé suspensory špičatého tvaru (Carneros a kol., 2009).

I během proliferace je velmi často se vyskytujícím jevem štěpná polyembryonie, při které má více vzniklých raných somatických embryí jeden společný suspenzor (Hakman a von Arnold, 1988, Svobodová a kol., 1999).

U smrku ztepilého proliferující embryogenní struktury prochází postupně až třemi na sebe navazujícími stádii, všechny tři kroky jsou charakterizovány různými buněčnými agregáty definovanými jako proembryonální hmota (PEM) I, PEM II a PEM III (Filonova a kol., 2000a). PEM I je formovaný shlukem malých meristemických buněk a jednou vakuolizovanou buňku. PEM II je velmi podobná s rozdílem, že zahrnuje mnohem více vakuolizovaných buněk. Větší rozdíl je možný pozorovat u PEM III, která je charakterizovaná shlukem prodloužených cytoplazmatických buněk a na ně navazující vakuolizované buňky. PEM III, které je poté přeneseno na maturační médium, se dále vyvíjí. Pokud se přenesou PEM I, či II, většinou dojde k degradaci. Bylo ukázáno, že populace PEM III na proliferacním médiu v průběhu času vzrůstá (32 % třetí den subkultivačního intervalu, 47 % šestý den sub. intervalu). Je možné, že neschopnost mnohých linií generovat kvalitní embrya plyne z omezeného množství PEM III, či abnormalit v této struktuře (Filonova a kol., 2000a, Stasolla a kol., 2003).



Obr. 6.3.3.1: Somatická embrya *P. koraiensis*. **a** 3 týdny stará embryogenní oblast (šipka) u druhu *P. koraiensis*. Úsečka v obrázku odpovídá 2 mm **b** Embryogenní kultura raných somatických embryí. Úsečka v obrázcích odpovídá 15 mm. Převzato z Li a kol. (2008).



Obr. 6.3.3.2: Proliferace somatických embryí. **a** Viditelně rozlišená embryogenní oblast *P. glauca* (e) a oblast buněk vysoce vakuolizovaných – suspensor (s). Převzato z Hakman a von Arnold (1988). **b** Rané somatické embryo *P. glauca*, charakteristické hustě cytoplazmatickými buňkami spojenými s prodlužujícími se buňkami suspensoru (s). Protodermální vrstva (šipka vpravo nahoře) se začíná diferencovat. Úsečka v obrázku odpovídá 100 μm . Převzato z Stastolla a kol. (2002). **c** Rané somatické embryo u *P. koraiensis* pozorovaná ve světelném mikroskopu. Úsečka odpovídá 100 μm . Převzato z Li a kol (2008).

6.3.4. Programovaná buněčná smrt v procesu SE

Během formování a vývoje somatických embryí u smrku ztepilého se vyskytují dvě po sobě jdoucí vlny programované buněčné smrti (Filonova a kol., 2000b). První je odpovědná za degradaci proembryonální hmoty, když se proembryonální hmota přetváří do somatických embryí. Druhá vlna programované buněčné smrti eliminuje terminálně diferencované embryonálně-suspensorové buňky na konci časně embryogeneze. Během konečné fáze programované buněčné smrti embryonálně suspensorová hmota buněk vykazuje progresivní autofagii, což má za následek formování velkých centrálních vakuol. Autolytická degradace v cytoplazmě je doprovázena začínající segmentací jádra. Nukleární DNA se fragmentuje do velkých úlomků po cca 50 kb a s násobky cca 180 pb. Prasknutí tonoplastu je odloženo až do momentu lýze cytoplasmy a buněčných organel včetně jádra, poté je lýze téměř kompletní. Protoplasma zmizí a buněčné tělo je reprezentováno pouze buněčnou stěnou (Filonova et al., 2000b).

Tento typ programované buněčné smrti je doprovázen výrazným poklesem extracelulárního pH (Bozhkov et al., 2002). Pokud nedojde k okyselení média, není signalizovaná programovaná buněčná smrt a přechod od proembryonální hmoty k dále se vyvíjejícímu somatickému embryu není umožněn. Proto jsou změny v pH vývojově velmi důležité a kulturou citlivě monitorované (von Arnold a kol., 2005).

6.4. Aromatické cytokininy

6.4.1. Cytokininy

Cytokininy představují jednu z pěti hlavních skupin fytohormonů (rostlinných hormonů). Fytohormony jsou nepostradatelnými látkami, jejichž funkcí je regulování růstových a vývojových procesů u rostlin. Definice cytokininů byla stanovena tak, že to jsou látky, které za přítomnosti auxinů (také jedna ze skupin fytohormonů) stimulují buněčné dělení (Tarjowski a kol., 2004). Mezi hlavní fyziologické účinky cytokininů spadá indukce a regenerace rostlinných orgánů, zpomalení stárnutí, potlačování apikální dominance či udržování vysoké metabolické aktivity rostlinných pletiv (Macháčková a kol., 1998).

Dle chemické struktury se cytokininy dělí do dvou hlavní skupin:

- 1) deriváty adeninu;
- 2) deriváty močoviny a thiomčoviny.

Přírozně se vyskytující cytokininy, které spadají do skupiny adeninového typu, se dělí dále na dvě různé větve dle postranního řetězce: A) aromatické cytokininy a B) isoprenoidní cytokininy (Tarjowski a kol., 2004).

V současnosti jsou známy stovky přírodních a syntetických cytokininů. Nejdříve objeveným cytokininem byl kinetin (Miller a kol., 1955) následovaný později zeatinem (Letham, 1963). Velmi dlouho byly v popředí zájmu především isoprenoidní cytokininy, zřejmě díky jejich vyššímu obsahu uvnitř rostlin. Předpokládalo se, že isoprenoidní cytokininy mají mnohem silnější efekt na růstové procesy zahrnující pokračování buněčného cyklu, zatímco aromatické cytokininy mají větší vliv na vývojové procesy, speciálně morfogenezi a senescenci rostlin (Holub a kol., 1998). Cytokininy jsou obvykle přítomny v nízkých koncentracích a jejich endogenní výskyt v rostlině je ve formě volných bazí, nukleosidů, glukosidů a nukleotidů (Doležal a kol., 2007).

Doposud dlouho využívanými druhy cytokininů během kultivace *in vitro* jsou: benzyladenin (BA), bynzylaminopurin (BAP), zeatin (Z) a kinetin (KIN) (Aremu a kol., 2012a).

Zhruba před dvaceti lety popsal tým vedený Prof. Miroslavem Strnadem (Univerzita Palackého v Olomouci) novou skupinu přírozně se vyskytujících aromatických cytokininů, které jsou často souhrnně označovány jako topoliny. Tyto nově objevené cytokininy představují mimořádně originální alternativu nejčastěji používaným syntetickým cytokininům. Nejprve byl popsán mT = meta-topolin (6-(3-hydroxybenzylamino)purin), který

byl izolován z listů *Populus x canadensis* (Strnad 1997, Strnad a kol., 1997). Následně byly identifikovány a izolovány další čtyři nové methoxylové deriváty MeoT (*ortho*-methoxytopolin), MemT (*meta*-methoxytopolin), MeoTR (*ortho*-methoxytopolin ribosid) a MemTR (*meta*-methoxytopolin ribosid), konkrétně u druhu *Arabidopsis thaliana* a opět také u druhu *Populus x canadensis* (Tarkowská a kol., 2003). Před časem se pochopitelně tyto nově objevené aromatické cytokininy dostaly do popředí zájmu, předpokládá se u nich řada výhod oproti isoprenoidním cytokininům.

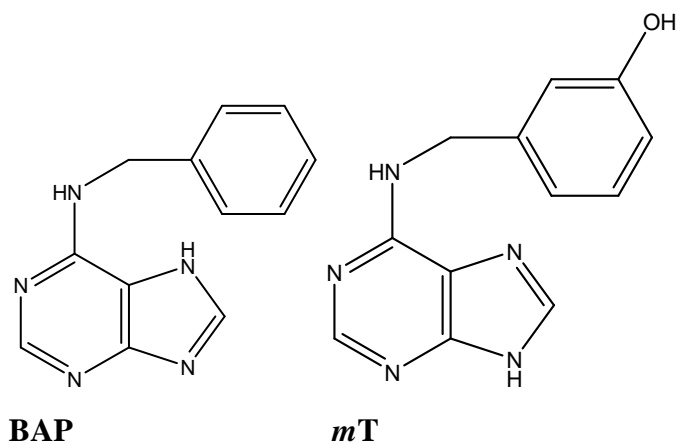
V recentní studii Aremu a kol. (2012a) je uvedena přehledná tabulka s výčtem všech rostlinných druhů, u kterých byly v *in vitro* podmínkách zkoumány rozdíly v použití různých cytokininů. Ke každému druhu je přiřazena nejvíce vhodná varianta cytokininu, jeho koncentrace a také charakteristické růstové parametry či případné fyziologické poruchy způsobené účinkem příslušného cytokininu. Autoři dochází k závěru, že topoliny představují slibnou skupinu cytokininů s pozitivními účinky na nejrůznější morfogenetické procesy (přestože to neplatí pro všechny druhy).

Werbrouck a kol. (1996) se zabývali ve své studii rozdílnými účinky cytokininů, které jsou běžně využívány (BA, BAP, (9R)BA), a zmíněným aromatickým cytokininem *mT*. Bylo zjištěno, že nově objevené topoliny jsou mnohem více odolné vůči cytokinoxidázám, jsou stabilnější a více aktivní v biologických systémech.

Topoliny, především *meta*-topoliny a jejich deriváty, redukuje výskyt různých fyziologických poruch vyvolaných při indukci organogenních procesů (Aremu a kol., 2012a).

Další poměrně nově objevenou skupinou fytohormonů jsou endogenní deriváty BAP, neboli methoxytopoliny, které taktéž vykazují vysokou biologickou aktivitu i v jiných než rostlinných systémech. Tato skupina látek má významné protirakovinné účinky a zároveň velmi dobře omezuje procesy stárnutí (Bogaert a kol., 2001, Bairu a kol., 2007, Malá a kol., 2009, De Diego a kol., 2010).

Některé nedávné studie přepokládají poměrně úzký vztah mezi druhem použitých cytokininů a následným metabolismem sacharidů (Brenner a kol., 2005, Hartig and Beck 2006, Radchuk a kol., 2010). Sacharidy představují primární zdroj uhlíku a energie pro růst a vývoj rostlin a mají další nezastupitelné funkce (signální osmotickou), jedná se tedy o velice významné zjištění.

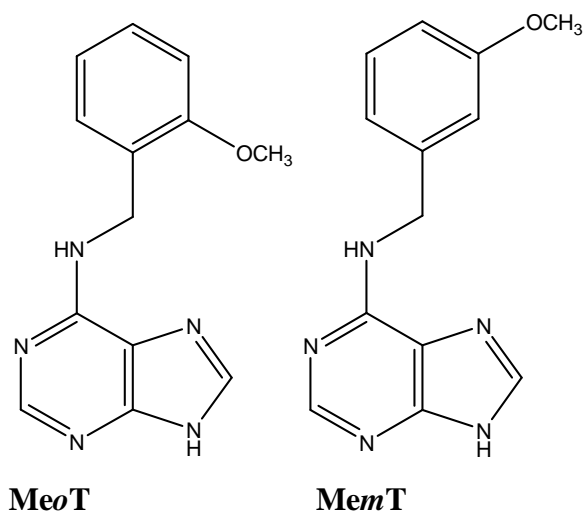


Obr. 6.4.1.1: Srovnání chemické struktury běžně používaného cytoninínu **BAP** (benzylaminopurín) a nových aromatických cytokininů:

mT: meta-topolin
= 6-(3-hydroxybenzylamino)purin

MeoT: *ortho*-methoxytopolin
= 6-(2-methoxybenzylamino)purine

MemT: *meta*-methoxytopolin
= 6-(3-methoxybenzylamino)purine



6.4.2. Vliv topolinů na množení rostlin *in vitro*

Pro praktické využití metod *in vitro* k množení rostlin je nezbytné správně zvolit typ a koncentraci (případně kombinaci) rostlinných regulátorů. Benzyladenin (BA) je jeden z nejméně efektivních a nejčastěji používaných cytokininů, který podporuje dělení buněk při kultivaci *in vitro*. Byly ale popsány systémy, kde použití BA není vhodné a k požadovanému výsledku nevede. Ve snaze vyřešit různé fyziologické a vývojové problémy spojené s tímto cytokininem byly zkoumány i účinky dalších cytokininů.

Při použití 10 μM koncentrace *mT* nebo BA byla u rostliny *Spathiphyllum floribundum* pozorována lepší rovnováha v prospívání nadzemních částí u varianty s *mT* (Werbrouck a kol., 1996). Podobných výsledků bylo dosaženo i u *Aloe polyphylla*, i zde mnohem lépe prospívala varianta ošetřená *mT* (zkoumány byly různé koncentrace a všechny prospívaly lépe), než další dvě porovnávané varianty s BA a Z. Za optimální koncentraci na indukci tvorby kořenů byla stanovena 5 μM *mT* (Bairu a kol., 2007).

Studie týmu Malá a kol. (2013) srovnává vliv dvou cytokininů na množení *in vitro* u druhu *Ulmus glabra* Huds., konkrétně BA a *mT*. Po třech měsících kultivace byla výtěžnost mikropropagace šestinásobně vyšší u ošetření *mT* než u BA. Rozdíly v délce kořenů produkovaných na *mT* a BA ovšem nebyly prokazatelné.

Ve studii u druhu *Musa* spp. (cv. Williams) bylo testováno celkem pět různých topolinů (*mT*, *mTR*, *MemT*, *MemTR* a *MemTTHP*), které byly zároveň porovnávány s BA, zvolené koncentrace byly 10, 20 a 30 μM . Nejvyššího počtu kořenů bylo dosaženo při ošetření 30 μM *mT*, ale nejdelší kořeny byly pozorovány u koncentrace 10 μM *mT*. Zlepšení zakořeňování během fáze vývoje kořenů byl pozorován u 10 μM *MemTTHP*. Míra regenerace kořenů u všech kultur byla v rozmezí 60 – 100 % (Aremu a kol., 2012b).

Zaznamenány byly také negativní reakce v prospívání rostlin při ošetření topoliny. Konkrétně u druhu *Rosa hybrida* L., která byla ošetřena *MemTR* a BA, byla nižší míra množení pozorována u varianty s *MemTR* (Bogaert a kol., 2006). Protože bylo dokumentováno množství dalších podobných reakcí, nelze zřejmě stanovit nějaké obecné pravidlo, dle kterého by bylo možné určit vhodný cytokinin pro konkrétní druh či morfogenní proces.

Dále bylo provedeno srovnání vlivu *mT* a BA u druhu *Citrus sinensis* (L.) Osbeck na kvalitu zakořeňování a počet explantátů, které produkují kořeny a jejich případnou délku. Testovány byly různé koncentrace v rozmezí 1–50 μM . Nejlepšího zakořeňování bylo dosaženo na médiu s BA o koncentraci 1 a 13,25 μM , zároveň u této varianty bylo pozorován i největší počet kořenů delších než 2 mm (Niedz a Events, 2011).

6.4.3. Vliv topolinů na zakořeňování a aklimatizování rostlin *ex vitro*

Chybějící či nedostatečné zakořeňování je jedním z největších problémů kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*. Existuje pozitivní korelace mezi dobrým zakořeňováním (především stimulováno auxiny) a schopností rostlin se rychleji aklimatizovat v přírodních podmínkách, což představuje velmi podstatný krok pro možné využití ve větším měřítku (Webrouck a kol., 1996). Během kultivace *in vitro* rostou rostliny při konstantní teplotě, nízké ozáření, vysoké relativní vlhkosti, mimo jiné mají v médiu cukry jako zdroj uhlíku, rozdíly oproti podmínkám *ex vitro* jsou tedy zřejmé (Pospíšilová a kol., 2007).

Některé studie ukazují, že druh a koncentrace cytokininů mohou mít hluboký účinek na následnou aklimatizaci rostlin, kromě toho ale někteří autoři uvádějí, že cytokininy obecně inhibují zakořenění a následkem toho je i špatná aklimatizace. Obecně používaný cytokinin BA navyšuje tvorbu kořenových částí rostlin (někdy až za vzniku nápadných abnormalit), velmi často je spojován i s negativními vedlejšími účinky při aklimatizaci některých druhů rostlin. Tyto škodlivé účinky jsou částečně v důsledku vzniků N-glykosidů BA, které jsou biologicky neaktivní a chemicky jsou velice stabilní. Rostliny ošetřené BA mají navíc tendenci tyto metabolity v sobě hromadit, a to především ve své bazální části (Webrouck a kol., 1995). Na rozdíl od tohoto se při použití *mT* ukazuje, že jeho metabolity jsou mnohem méně stabilní, a tudíž toto ošetření vykazuje mnohem menší toxicitu pro kultury (Webrouck a kol., 1996). Přítomnost hydroxylové skupiny u topolinů se jeví jako výhoda oproti BA, topoliny mohou projít O-glukosylací a vytvořit tak zásobní formy (Bairu a kol., 2011b). Potvrzením je i nedávná studie u druhu *U. glabra*, kdy byla mnohem vyšší koncentrace O-glukosidů detekována v explátech kultivovaných na médiu s *mT* (Malá a kol., 2013).

Webrouck a kol. (1996) zjistili pozitivní stimulaci kořenové aktivity u *S. floribundum* díky *mT* ve srovnání s BA. Koncentrace 20 μM BA inhibovala tvorbu kořene, většina vzniklých kořenů byla menších než 1,5 cm. Na médiu obsahující 5 až 10 μM *mT* bylo množství kořenů pod 1,5 cm větší. Mezi všemi čtyřmi testovanými cytokininy (BA, BAP, (9R)BA, *mT*) nebyly žádné prokazatelné rozdíly v počtu kořenů větších než 1,5 cm. U ošetření 10 μM *mT* bylo prokazatelně pozorováno nejlepší zakořeňování, než u jiných testovaných variant (Webrouck a kol., 1996).

Podobně *mT* a *mTR* podporovaly zakořenění *A. polyphylla*, zde dokonce více než 91 % rostlin kultivovaných na *mT* se následně úspěšně aklimatizovalo, rostlin kultivovaných na BA přežilo pouze 65 % (Bairu a kol., 2007).

Studie týmu Malá a kol. (2009) se zabývala vlivem tří různých derivátů aromatických cytokininů na mikropropagaci *in vitro* u druhu *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. Konkrétně se jednalo o cytokininy: BAP, *mT* a MeOBAP (6-(3-methoxybenzylamino)purine). Nejvyššího výnosu mikropropagace bylo dosaženo u varianty s přidáním BAP – 24 nových výhonů na explantát po 3 měsících kultivace. Ale nejlepšího zakořenění bylo dosaženo na médiu obsahujícím MeOBAP. Bylo zjištěno několik rozdílů v endogenních hladinách použitých cytokininů. Inhibování zakořeňování a problémy s aklimatizováním nově vytvořených rostlin byly nejvíce pozorovány u varianty média s BAP. To potvrdily i výsledky dalšího experimentu, který se zabýval tím, jak příslušné rostliny byly schopny zakořenit. Nejnižší procentuální úspěšnost v zakořenění po 6 týdnech byla pozorována u varianty s BAP. Ovšem

BAP byl zároveň nejefektivnější v indukční fázi formování embryonální hmoty z primárních explantátů (Malá a kol., 2009).

Pozitivní vliv topolinů na zakořeňování ovšem opět nejde zobecnit. Inhibiční vlivy byly pozorovány u *Musa* spp. při použití *mT* nebo *mTR* o koncentraci 22,2 μM , lépe si vedl BA (Bairu akol., 2008). V jiné studii, provedené na jednom druhu jitrocele, byly porovnávány různé koncentrace BA a *mT*. Při použití vysokých koncentrací si lépe vedl v indukci zakořeňování BA, ovšem nejlepších výsledků v produkci počtu kořenů bylo pozorováno s 1,33 μM *mT* (Escalona a kol., 2003). To naznačuje, že nejvíce efektivních výsledků se dosahuje při zvolení topolinů o nižších koncentracích, naopak vysoké koncentrace topolinů mají velmi škodlivé následky (Aremu a kol., 2012a).

Velmi důležitým aspektem je i interakce cytokininů s auxiny. Výsledky analýz ukazují, že převažující dosavadně používané cytokininy isoprenoidního typu (BA, BAP, atd.), utváří substráty pro enzymy, které následně degradují auxiny. Tedy po jejich aplikování se navyšuje citlivost k cytokininům a auxinům, které jsou nedílnou součástí nejrůznějších kultivačních médií (Chalupa a kol., 1990, Malá 1991).

Rozdíly v produkci rostlinného hormonu ethylen (hormon hrající důležitou roli při kontrole organogeneze v tkáňové kultuře) byly pozorovány mezi jednotlivými variantami médií, které byly testovány (BAP, *mT* a MeOBAP) u druhu *S. tormalis*. Nejvyšší hladina ethyleny byla detekována u varianty média s přidáním *mT*, hodnoty byly až čtyřikrát vyšší než u jiných použitých médií. U varianty s BAP bylo pozorováno, že hladina auxinů je v tomto médiu nejnižší (Malá a kol., 2009). Také u druhu *U. glabra* byl podstatně vyšší obsah ethyleny detekován v kultuře na médiu s obsahem *mT* (Malá a kol., 2013).

6.4.4. Pozitivní vlivy topolinů na snižování abnormalit vyskytujících se u rostlin během jejich kultivace *in vitro*

6.4.4.1 Vliv na přehnanou hydrataci pletiv (hyperhydricita)

Hyperhydricita (nebo také hyperhydratace) je morfologická a fyziologická porucha pozorovaná při *in vitro* produkci rostlin. Je způsobená buď pasivní difúzí vody do pletiv rostliny, nebo je aktivním jevem, který má souvislost s poruchami rostlinného metabolismu. Je to běžný problém pozorovaný u kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách, který bohužel

v některých systémech stále brání úspěšně využívat tyto metody pro masovou produkci rostlin (Debergh a kol., 1992).

Bairu a kol. (2007) sledovali vliv topolinů na hyperhydrataci u *A. polyphylla*. Jako optimální byla v této studii pozorována koncentrace *mT* 5 μM , u ošetření vyššími koncentracemi již byla pozorována zvýšená hydratace pletiv. Nejvíce hydratovaná byla pletiva pokud jako součást média byl použit BA. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i u *Beta vulgaris*, i zde byla hydratace nižší na nižších koncentracích *mT* (Kubaláková a Strnad, 1992).

6.4.4.2 Vliv na nekrózu kořenové čepičky rostlin

Nekróza kořenové čepičky je běžně pozorovanou abnormalitou kořene během kultivace v podmínkách *in vitro*, často je doprovázena následným hnědnutím pupenů a listů, a může následně vést až ke smrti celé rostliny. Tyto symptomy jsou důsledkem stárnutí a odumírání pletiv ještě v apikálním meristému. Nekróza je způsobena kombinací více faktorů, např. účastí procesů programované buněčné smrti a vlivem cytokininů. Právě vliv cytokininů je údajně nejvíce dominantní (Bairu a kol., 2009c). Rychlost odumírání kořenové čepičky se adekvátně zvyšuje se zvyšující se koncentrací použitých cytokininů. Bairu a kol. (2009a) pozorovali u *Harpagophytum procumbens* významně nižší nekrózu u varianty ošetřené *mTR* ve srovnání s variantou kultivovanou na médiu s BA. Podobných výsledků bylo dosaženo i u *Barleria greenii* při ošetření *MemTR* (Amoo a kol., 2011). U druhu *Musa* spp. bylo nejméně abnormalit pozorováno při ošetření *mTR*, u všech ostatních variant se úměrně se zvyšováním koncentrací opět zvyšovalo i procento abnormalit (Aremu a kol., 2012b).

6.4.4.3 Vliv na předčasnou senescenci rostlin

Senescence, neboli stárnutí rostlin, je geneticky naprogramovaný proces, který je obecně řízen mnoha vnitřními i vnějšími vlivy. Má se za to, že spolu s ABA, auxiny či ethylenem jsou cytokininy nejvýznamnějšími regulátory rostlinné senescence (Van Staden a kol., 1988).

Předčasná senescence je poměrně často se vyskytujícím problémem u mnoha druhů rostlin v průběhu jejich kultivace *in vitro*. U sedmi odrůd *Pelargonium* bylo porovnáváno ošetření *mT* a BA, a bylo prokázáno, že *mT* mnohem lépe inhibuje předčasnou senescenci. Dále bylo pozorováno, že rostliny *Pelargonium*, které byly ošetřeny *mT*, mají ve svých listech vyšší obsah chlorofylu (Wojtania, 2010).

U modelové rostliny *R. hybrida* zkoumal jiný tým vlivy BA a topolinů na průběh kultivace a senescenci této rostliny, zde byla nejvíce úspěšná varianta s přidáním MemTR. Dalším zajímavým pozorováním byl fakt, že po 18 týdnech kultivace u varianty s MemTR prospívalo 50 % rostlin, ale u ostatních variant přežívalo pouze 18 % (Bogaert a kol., 2006).

Dalším druhem, u kterého byly studovány vlivy topolinů na senescenci, je cukrová řepa. I zde bylo potvrzeno, že u rostlin pěstovaných na mTR byla senescence zpožděna, a dokonce byl následně pozorován i větší výnos v porovnání s neošetřenou kulturou. Tyto účinky byly spojeny se sníženou respirací rostlin a se stimulací membránového transportu (Kotyk a kol., 1996). S ohledem na význam oddálení senescence se doporučuje používání topolinů k ošetření jak v podmínkách *in vitro*, tak i *in vivo*.

6.4.4.4 Vliv na histogenetickou stabilitu

Histogenetická stabilita představuje velmi zásadní faktor ve využití mikropropagace rostlin v komerční sféře, jedná se konkrétně o zachování již existujících změn (chiméry) a předcházení nežádoucím (somaklonálním) variabilitám (Bairu a kol., 2011a).

Především u okrasných druhů je velmi žádoucí zachovat již existující genetické složení kultur (vzniklé chiméry), především kvůli jejich obchodní hodnotě. V současnosti je jediným účinným nástrojem používaným při mikropropagaci okrasných rostlin KIN, který zajišťuje jejich pomalou a bezpečnou regeneraci. KIN je ovšem relativně slabý cytokinin, a často je spojován s nižší schopností růstu kořenového systému regenerovaných rostlin. Tyto nevýhody by zřejmě mohly být částečně vyřešeny použitím topolinů (Amoo a kol., 2011). U meristému druhu *Petunia* byla histogenetická stabilita vylepšena právě použitím topolinu, konkrétně se jednalo o MemTR, kontrolní variantou opět byla varianta s BA. Mimo toho byl dále pozorován pozitivní vliv na vizuální kvalitu axilárních výhonů (Bogaert a kol., 2006).

V průběhu kultivace rostliny *B. greenii*, která byla původně udržována na médiích s obsahem BA, autoři zjistili, že četnost výskytu abnormalit při ošetření pomocí mTR a MemTR byl mnohem nižší než v kontrolní variantě ošetřené klasicky pomocí BA. Bylo navrženo, že výskyt zmíněných abnormalit u variant ošetřených mTR a MemTR byl přeneseným účinkem BA z původního udržovacího média (Amoo a kol., 2011).

6.4.5. Jaké poznatky byly o aromatických cytokininech doposud popsány u jehličnanů?

Obecně je doposud známo velmi málo studií zabývajících se vlivem různých aromatických cytokininů na regenerační procesy studované v podmínkách *in vitro* u jednotlivých druhů jehličnanů. Většina těchto studií je zaměřena na studium regenerace nebo regenerace *de novo* u různých druhů borovic. Jednotlivé poznatky budou níže uvedeny.

Ve studii provedené na borovici *Pinus sylvestris* (L.) Trees byla studována mikropropagace regenerací *de novo* z dormantních pupenů (De Diego a kol., 2010). Explantáty z řezů pupenů byly kultivovány na médiích doplněných o čtyři různé cytokininy (BA, *mT*, TDZ a Z), ve dvou koncentracích (25 a 50 μM). Výjimkou bylo TDZ, u kterého byly zvolené koncentrace 5 a 2,5 μM . Nejlepších výsledků, tedy nejvyššího procenta úspěšné organogeneze, bylo pozorováno u varianty kultivované na médiu s přidáním nižší koncentrace (25 μM) *mT* (De Diego a kol., 2010). Autoři se na základě výsledků domnívají, že *mT* mohl být úspěšnou alternativou k dosud používaným cytokininům, především BA. Déle se domnívají, že exogenně aplikované aromatické cytokininy mohou vyvolat oživení již dospělých pupenů, což může být s výhodou využito pro množení vzácných genotypů (De Diego a kol., 2010).

U dalšího druhu borovice *P. pinea* byla studována regenerace z axilárních pupenů po indukci a následné kultivaci explantátů získaných z primordií brachyblastů dospělých stromů na médiích obsahující různé cytokininy (Cortizo a kol., 2009). Konkrétně byly testovány čtyři různé cytokininy: BA, *mT*, N-benzyl-9-(2-tetrahydropyranil)-adenin a TDZ. Nejpriznivějších výsledků po ošetření dosahoval TDZ, kdy na médiu s přidáním 1 μM TDZ pupeny úspěšně prorůstaly ve výhon celkem u 59 % explantátů. Zároveň byla pozorována rozdílnost v rezpozivitě na konkrétních genotypových buněčných liniích. Posuzováno bylo celkem 20 různých genotypových linií a u všech byl nejlepší výsledek na médiu s přidáním TDZ. Práce se zároveň pokoušela optimalizovat protokol týkající se zakořeňování v podmínkách *in vitro*, ten se ale nepodařilo finalizovat. Při studiu regenerace *de novo* po indukci z děloh u druhu borovice *P. pinea* autoři Cuesta a kol. (2012) sledovali změny v hladinách volných basí, ribosidů, ribotidů, glykosidů jak izoprenoidních tak aromatických cytokinů v závislosti na exogenní aplikaci cytokininů BA. Před aplikací BA dominovaly obsahu endogenních cytokininů isoprenoidní cytokininy, ale jednu hodinu po aplikaci tvořily aromatické cytokininy až 90 % obsahu endogenních cytokininů.

Vliv různých cytokininů (BA, T, *mT* a Z v různých koncentracích) byl studován na indukci adventivních výhonů ze zygotických embryí *Pinus radiata* D. Don, během *in vitro* kultivace a indukce zakořeňování na následný vývoj *ex vitro*. Nejvyšší počty adventivních výhonů na embryo, byly zaznamenány u variant s přidáním 1 μM BA po dobu kultivace 2 týdnů, 4,4 μM BA po dobu 3 týdnů a 1 μM Z po dobu opět 3 týdnů kultivace (Montalbán a kol., 2011).

Schopnosti aromatických cytokininů omlazení pupenových meristémů bylo testováno pro podporu rejuvenalizace pupenů u dospělých stromů *P. radiata*, kde je přechod z juvenilní fáze do fáze dospělosti charakterizován snížením organogenního potenciálu (Montalbán a kol. 2013). Autoři testovaly vliv cytokininů (BA, *mT* a transzeatin v koncentracích 25 a 50 μM) na různé fáze organogenního procesu, zároveň byl sledován vliv kultivačních podmínek na endogenní hladinu cytokininů a IAA v průběhu organogeneze. Při použití BA či *mT* v indukčním médiu nebylo pozorováno žádné významné zvýšení nebo naopak snížení obsahu endogenních isoprenoidních cytokininů. Zároveň nebyly pozorovány ani rozdíly v kapacitě prodlužujících se výhonků v závislosti na zvoleném cytokininu. V této studii byly pozorovány znatelné rozdíly v kvalitě genotypových buněčných linií, celkem bylo testováno 76 různých genotypů a pouze některé z nich dosahovaly vysokých embryogenních kvalit (Montalbán a kol., 2013).

V jiné studii zabývající se mikropropagací druhu *Pinus pinaster* byly počáteční explantáty získány ze zygotických embryí. Explantáty, které byly kultivované na médiu s přidáním 2,2 μM *mT*, vykazovaly během indukce nejvyšší embryogenní odpověď ze všech porovnávaných variant, vzniklé embrya velmi dobře prospívala i v následném vývoji, prodlužovala se a jejich úspěšné formování probíhalo až do aklimatizační fáze. Takto ošetřené explantáty vykazovaly vysoké procento přežití 96,7 % v následné aklimatizační fázi v podmínkách *ex vitro*. Všechny rostliny, které úspěšně zakořenily, vydržely v aklimatizační fázi po dobu dalších dvou měsíců v rámci *ex vitro* podmínek (De Diego, 2011).

Je možno shrnout, že odpověď jednotlivých genotypů na různé cytokininy a jejich koncentrace je často závislá na genotypu (Cortizo a kol., 2009, Montalban a kol. 2012). Zvýšení obsahu aromatických cytokininů je spojováno s rezpozivitou genotypu k indukčním podmínkám. Při studiu regenerace *de novo* výhonů z děloh po indukci u druhu borovice *P. pinea* byl nejvyšší obsah aromatických cytokininů pozorován u nejvíce rezpozivního genotypu (Cuesta a kol. 2012). Tedy autoři vyvozují, že aromatické cytokininy hrají aktivní úlohu v indukci regenerace výhonu *P. pinea*.

7. MATERIÁL A METODY

7.1. Rostlinný materiál

Veškerá experimentální část diplomové práce byla provedena na embryogenních kulturách smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.). Kultury byly odvozeny ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti v Jílovišti – Strnadlech týmem Dr. Jany Malé, zde byly také kultivovány a v pravidelných intervalech odebírány. Jedná se konkrétně o linie označené 107 a 34C.

K porovnání s těmito dvěma kulturami byla použita ještě linie AFO 541, která je velmi unikátní kulturou *P. abies*. Byla odvozena již v polovině 90. let a doposud má velmi kvalitní embryogenní potenciál (Galerie a kol., 1992; Ruaud a kol., 1992). Materiál této kultury byl získán od Dr. Vágnera z ÚEB a je nyní pěstován v rámci grantu GAUK na Katedře experimentální biologie rostlin, PřF UK.

7.2. Kultivační postup

7.2.1. Složení kultivačního média a kultivace

Kultury 107 a 34C byly pěstovány na modifikovaném médiu E (Gupta a Durzan, 1986) (složení viz tabulka č. 7.2.1.1), které bylo zpevněné gelritem (2 g/l). Jako exogenní zdroj energie byla použita sacharóza (20 g/l).

Příprava média probíhala následovně: nejprve se odměřily a smíchaly jednotlivé zásobní roztoky a doplnily se destilovanou vodou na požadovaný objem. Zásobní roztok 4 se uchovává v mrazáku, před použitím se rozpouští ve vodní lázni. Po smíchání všech roztoků se změřilo jejich pH, v případě potřeby se poupravilo (požadovaná hodnota pH je u média GD 5,7 a u E 5,8). Na závěr se přidala zpevňující složka (Gelrite nebo Phytigel; obojí Sigma, ČR). Následně se médium přivedlo k varu v mikrovlnné troubě a poté se sterilizovalo klávkováním po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa.

Kultura AFO 541 byla kultivována na modifikovaném médiu GD (Gupta a Durzan, 1986) (složení viz tabulka 7.2.1.2). Postup přípravy média je shodný.

Všechny použité kultury byly pěstovány na médiu ve tmě při 25 °C. Subkultivační interval u kultur 107 a 34C byl dlouhý 4 týdny, u kultury AFO 541 byl subkultivační interval jeden týden.

	Látka	Koncentrace látky v médiu
Složka I (minerální živiny) Zásobní roztok 1	KNO ₃ NH ₄ NO ₃ CaCl ₂ * 2H ₂ O MgSO ₄ * 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄	2340 mg/l 225 mg/l 220 mg/l 185 mg/l 85 mg/l
Zásobní roztok 2	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ *H ₂ O ZnSO ₄ *7H ₂ O KI Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O CuSO ₄ *5H ₂ O CoCl ₂ *6H ₂ O	3,1 mg/l 11,2 mg/l 4,3 mg/l 0,4 mg/l 0,1 mg/l 0,01 mg/l 0,01 mg/l
Zásobní roztok 3	Na ₂ EDTA FeSO ₄ *7H ₂ O	18,6 mg/l 3,9 mg/l
Složka II (organické látky) Zásobní roztok 4	Thiamin Pyridoxin Kys. nikotinová Glycin	1,0 mg/l 0,5 mg/l 0,5 mg/l 1,0 mg/l
Další složky	putrescin L- glutamin Myo-inositol	1,5 mg/l 450 mg/l 1000 mg/l
Zásobní roztok fytohormonů	2,4-D kinetin BAP meta-topolin	1,0 mg/ml 0,5 mg/ml 0,5 mg/ml 0,5 mg/ml

Tabulka 7.2.1.1: Složení modifikovaného média E dle Gupta a Durzan (1986). Používané pro kultivaci kultur 107 a 34C. Další složky média byly sacharóza (20 g/l) a gelrit (2 g/l).

Složka	Látka	Koncentrace látky v médiu
A – makroprvky (50 ml na 1l média)	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ CaCl ₂ MgSO ₄ * 7 H ₂ O KH ₂ PO ₄	275 mg/l 2 340 mg/l 166 mg/l 185 mg/l 85 mg/l
A – mikroprvky (10ml na 1l média)	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ *H ₂ O ZnSO ₄ *7H ₂ O KI Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O CuSO ₄ *5H ₂ O CoCl ₂	3,1 mg/l 8,45 mg/l 4,915 mg/l 0,415 mg/l 0,125 mg/l 0,0125 mg/l 0,0068 mg/l
A – železo (10ml na 1l média)	FeSO ₄ *7H ₂ O Na ₂ EDTA	14 mg/l 19 mg/l
B – organické doplňky (25ml na 1l média)	glycin L- glutamin	1 mg/l 450 mg/l

	kasein-hydrolyzát	500 mg/l
	myo-inositol	1000 mg/l
	kyselina nikotinová	0,25 mg/l
	pyridoxin.HCl	0,25 mg/l
	thiamin.HCl	0,5 mg/l
C – růstové regulátory (25ml na 1l média) (2 roztoky C s BAP a bez BAP)	2,4-D	1,1 mg/l
	kinetin	0,43 mg/l
	BAP	0,43 mg/l
	topolin	0,43 mg/l

Tabulka 7.2.1.2: Složení pozměněného média GD (Gupta a Durzan, 1986) používaného ke kultivaci AFO 541. Další složky média byly 3% sacharóza, 3,5% polyethylenglycol (PEG 4000), 4 % Phytigel.

7.3. Metody

7.3.1. Odběr vzorků

Odběry probíhaly v datech znázorněných na schématu 7.3.1.1. U první kultivované linie 107, která byla nasazena na proliferační médium 11.4.2011, byly provedeny celkem čtyři odběry, vždy po čtyřech týdnech. Všechny odběry byly provedeny v proliferační fázi, následně kultura přestala z neznámých důvodů prosperovat. Po přenesení kultury na maturační médium vůbec nenastala maturační fáze vývoje, proto byla kultivace zastavena.

Následně byla pro experimenty použita nová kultura - linie 34C, pěstovaná na shodném proliferačním médiu. Tato kultura byla nasazena na proliferační médium 21.9.2011, odběry byly opět prováděny v rozmezí 4 týdnů. Bohužel nastal opět problém v kultivaci, kdy kultura po dvou úspěšných odběrech byla silně postižena kontaminací a další odběry již nenastaly.

Obě kultury byly pěstované ve dvou experimentálních variantách, na médiu s přídatkem *mT* a na médiu s přidáním BAP (složení média viz kap. 7.2.1.).

Pro porovnání kultur mezi sebou, v tom, jaký mají jednotlivé kultury embryonální potenciál, byl použit ještě odběr kultury, která slouží jako určitý referenční materiál, konkrétně kultury AFO 541. Ta je již velmi dlouho využívána a po více než 20 let si uchovává dobrou a relativně stabilní embryogenní kapacitu. Navíc je velice dobře prozkoumána a je o ní dobře známo, jak se chová i v dalších fázích somatické embryogeneze, které navazují na proliferaci. Odběr byl proveden 16.10.2012, opět na proliferačním médiu, s tou výjimkou, že byla odebrána pouze varianta BAP.

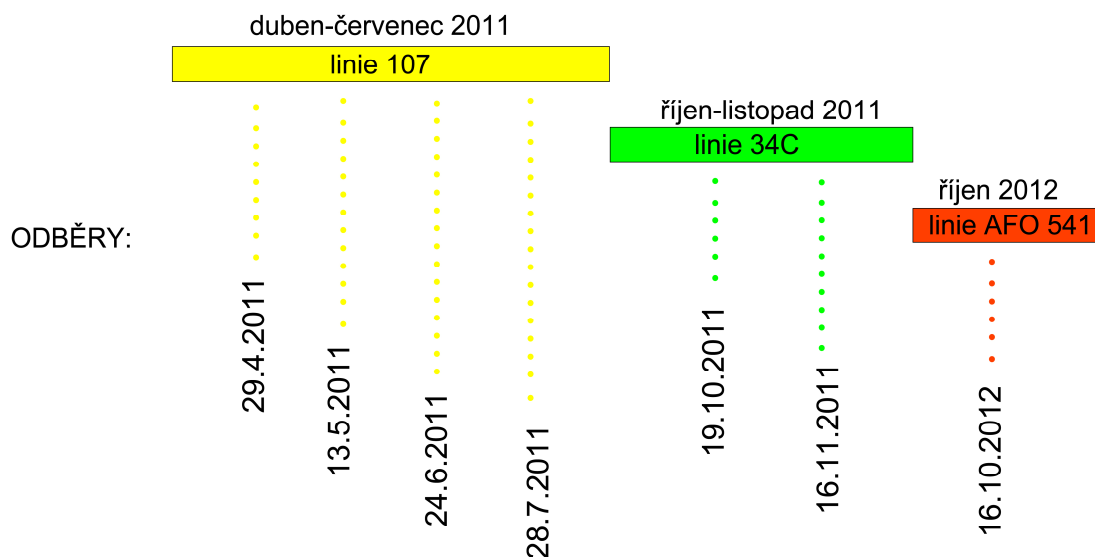


Schéma 7.3.1.1: Časové schéma jednotlivých odběrů kultur 107, 34C a AFO 541.

7.3.2. Příprava trvalých preparátů

K pozorování embryogenních struktur světelným mikroskopem a následně pořizování fotografií, byly připraveny parafínové řezy (Němec a kol., 1962).

Nejprve byly odebrané vzorky fixovány v 50% FAA (formaldehyd/kyselina octová/ethanol/voda 1/1/9/9/ v/v/v/v). Následně byly dehydratovány ve vzestupné ethanol-butanolové řadě a zalité parafínem do bločků. Všechny parafínové bločky byly postupně nataveny na dřevěné špalíčky pomocí preparační jehly a řezány na konzolovém mikrotomu (Leica, Leica instruments GmbH, Německo). Tloušťka řezů byla 12 μm . Vzniklé řezy byly k podložnímu sklíčku přichyceny směsí glycerol-bílek (1/1).

Řezy byly barveny dvoustupňovým barvením za použití alciánové modři a pravé jádrové červeně (Poláčková a Beneš, 1975). Pravá jádrová červeně zvýrazňuje chromatinové struktury (jádra) a alciánová modř celulózní buněčné stěny. Díky tomu jsou meristemické části zvýrazněny oproti nemeristemickým strukturám. Podrobný rozpis barvení viz box 7.3.2.1 a box 7.3.2.2.

Na uzavření preparátu byl použit PERTEX (Histolab AB, Švédsko), který se nanese na podložní sklíčko s již nabarvenými preparáty a zakryl se krycím sklíčkem.

Box 7.3.2.1: Postup barvení pravou jádrovou červení (Kernechtrot) a alciánovou modří:

Samotné barvení začíná použitím toluenu, čímž je zajištěno odparafinování řezů, následuje sestupná alkoholová řada společně s destilovanou vodou k zavodnění preparátů. Poté se provede samotné barvení, nejprve alciánovou modří a poté pravou jádrovou červení, vždy s mezikrokem vodní lázně (destilovaná voda – odstranění přebytečného barviva). Následuje vzestupná alkoholová řada, která způsobí odvodnění preparátů. Nakonec se preparáty třikrát promyjí v toluenu.

Toluen I	3 min.
Toluen II	2 min.
Toluen III	2 min.
100% ethanol	3 min.
100% ethanol	3 min.
96% ethanol	3 min.
70% ethanol	3 min.
50% ethanol	3 min.
30% ethanol	3 min.
Destilovaná voda	3 min.
3% kyselina octová	1 min.
Alciánová modř	20 min.
Destilovaná voda	5-10 min. (dokud se odbarvuje)
Pravá jádrová červeně	1-2 min.
Destilovaná voda	5-10 min. (dokud se odbarvuje)
30% ethanol	3 min.
50% ethanol	3 min.
70% ethanol	3 min.
96% ethanol	3 min.
100% ethanol	3 min.
Toluen I	3 min.
Toluen II	3 min.
Toluen III	3 min.

Box 7.3.2.1: Postup pro namíchání pravé jádrové červeně (Kernechtrot) a alciánové modří:

Alciánová modř: 0,1% barvivo v 3% roztoku kyseliny octové ... 80°C teplý roztok, poté přefiltrovat

Pravá jádrová červeně (= Kernechtrot): 0,5% barvivo v 5% roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$... 80°C teplý roztok, poté přefiltrovat

7.3.3. Kvantitativní analýza struktur

Z každého odběru bylo vytvořeno celkem 12 preparátů, digitální mikrofotografie byly pro následné zpracování v programu Ellipse pořizovány na zvětšení 40x pod světelným mikroskopem (Olympus B201), pole pro snímání anatomických struktur kultur byly určeny na principu systematicky rovnoměrně náhodného vzorkování (např. Albrechtová a Kubínová 1999; posun byl o 500 μm). Snímán byl vždy náhodně vybraný řez z prvního, pátého a

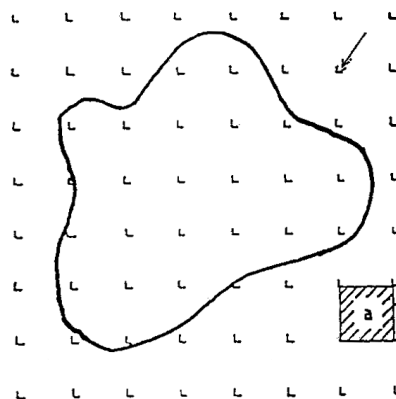
jedenáctého preparátu, tímto bylo při tloušťce řezů 12 μm zaručeno, že nebude snímána stejná struktura vícekrát v jiné rovině řezové. Z každého tohoto řezu bylo nasnímáno vždy 12 polí, celkem tedy na každý odběr 36 snímků. Následně byly mikrofotografie zpracovávány bodovou metodou v programu Ellipse (podrobný popis viz kap. 7.3.3.1). Celkem bylo v diplomové práci zpracováno 468 snímků, aby bylo dosaženo souboru dat s dostatečně velkou vypovídající hodnotou.

Získané hodnoty byly zaznamenány a následně zpracovány v programu Microsoft Excel, ve kterém byly vytvořeny všechny uvedené grafy. Ke statistickému vyhodnocení byl použit program NCSS 6.0, konkrétně jednovýběrová ANOVA (analýza rozptylu) a dvouvýběrová ANOVA. Statické hodnocení bylo konzultováno s dr. Jiřím Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR.

7.3.3.1 Poměrné zastoupení anatomických struktur

Poměrné zastoupení jednotlivých anatomických struktur se zjišťovalo pomocí programu Ellipse. Použita byla bodová metoda pro měření plochy (Weibel, 1979), kde se počítá počet zásahů do pozorované struktury z bodového testovacího systému, který se skládá ze systematicky rovnoměrně náhodně rozmístěných bodů. Tento počet zásahů je pak vynásoben plochou odpovídající jednomu bodu testovacího systému (obr. 7.3.3.1.1)

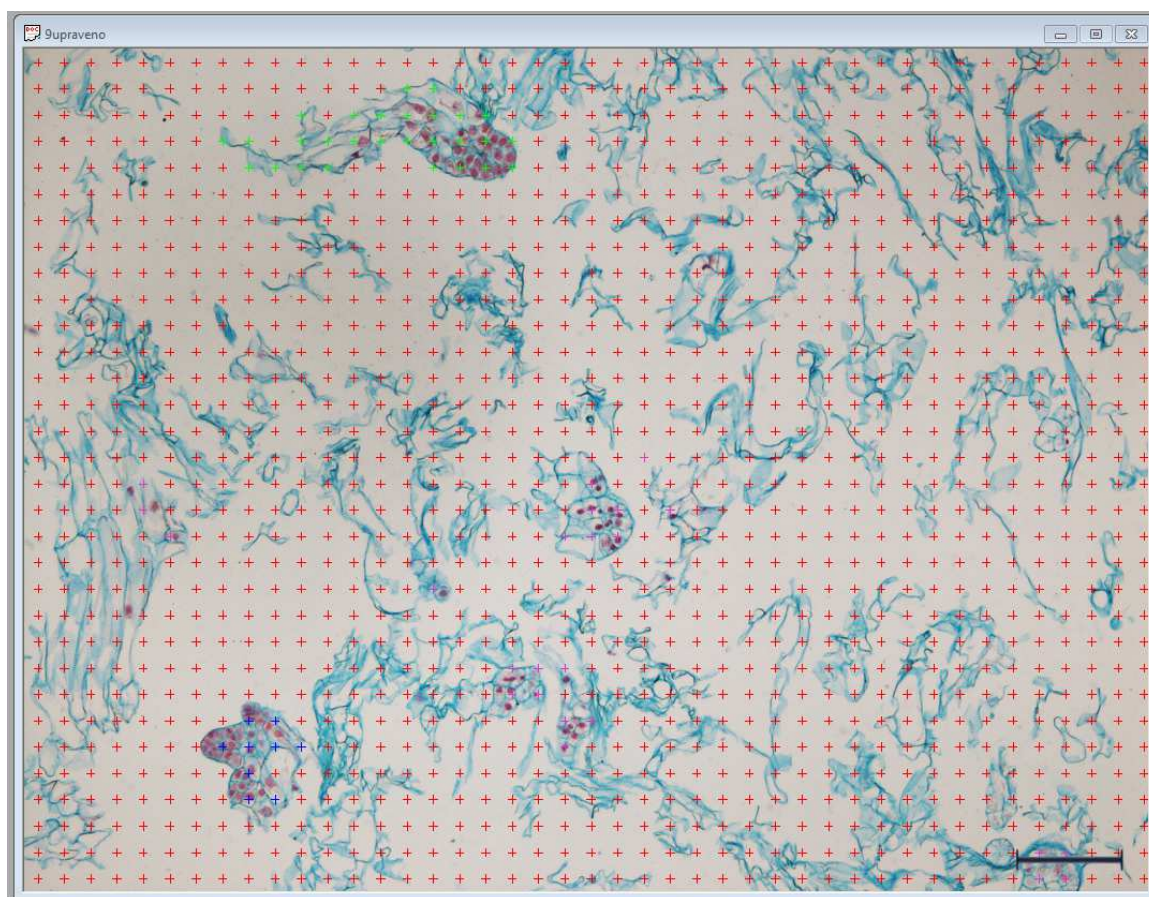
Pro vhodné použití této metody pro stanovení poměrného zastoupení jednotlivých struktur bylo potřeba určit si jednotlivá kritéria, podle kterých jsem následně rozeznávala jednotlivé kategorie. Definování a popis jednotlivých kategorií je součástí následující kapitoly (8. Výsledky).



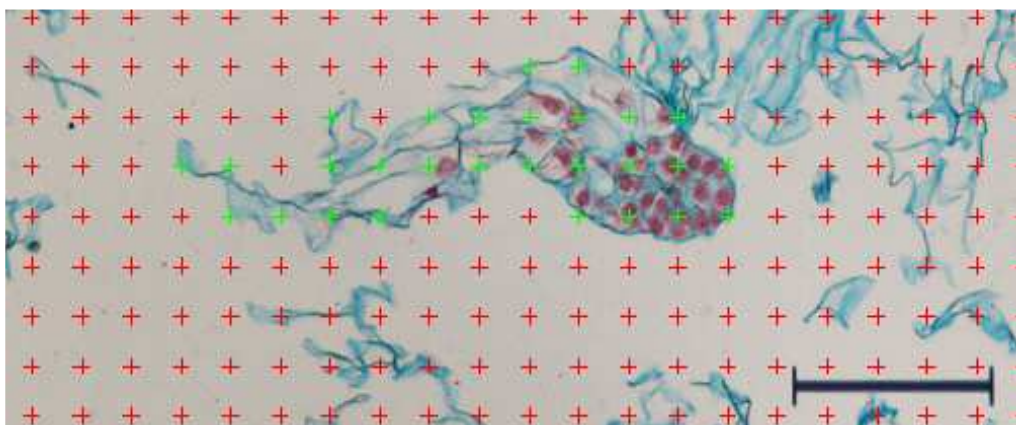
$$estA = P * a$$

Obr. 7.3.3.1.1: Schéma znázorňující princip bodové metody (Weibel, 1979) a příslušný vzorec pro výpočet plochy jednotlivých struktur. **P** je číslo (počet) testovaných bodů, které zasahovaly měřenou strukturu, **a** je (aktuální) plocha, která náleží jednomu bodu v testovacím systému. Schéma převzato z Albrechtová a Kubínová (1999).

V programu Elipse si nadefinujeme rovnoměrně náhodnou mřížku (modul: PG_Multi_FG) (obr. 7.3.3.1.2, 7.3.3.1.3). Její hustota je uváženě zvolená podle velikosti měřených struktur. Každé námi definované kategorii přiřadíme v programu nějakou barvu, kterou poté bude struktura označena. V mé práci jsem si nadefinovala celkem šest různých kategorií, proto byly použity celkem dvě mřížky, v jedné mřížce mohou být až čtyři kategorie. V obou mřížkách jsem měla tedy po třech kategoriích, mezi těmito mřížkami se lze v programu libovolně přepínat. Kliknutím na křížek označující strukturu měníme barvu tohoto křížku a tím i jeho zařazení do kategorie. Poté, co všechny křížky jsou správně obarvené, tedy správně přiřazené do jednotlivých kategorií, získáme potřebné hodnoty. Jedná se o počet zásahů v každé kategorii, z toho již jednoduchým výpočtem získáme plošné zastoupení jednotlivých struktur (kategorií) v dané konkrétní fotografii (obr. 7.3.3.1.1).



Obr. 7.3.3.1.2: Ukázka pohledu na mřížku z programu Ellipse přiložené na strukturu kultury v proliferační fázi. Je zde vidět různé barevné označení jednotlivých kategorií. Úsečka odpovídá délce 200 μm .



Obr. 7.3.3.1.3: Vybraný detail ukázky pohledu na mřížku z programu Ellipse přiložené na rané somatické embryo, je zde vidět zeleně vyznačené rané somatické embryo spadající do kategorie kvalitní raná somatická embrya (viz kap. 8.2.1). Úsečka odpovídá délce 200 μm .

7.3.3.2 Poměrné zastoupení meristemické struktury u raných somatických embryí

Pomocí programu Image J bylo navrženo hodnocení poměrného zastoupení meristemické části struktury u kategorie Kvalitní rané embryo (popis kategorie kap. 8.2.1). Pro tento cíl byly vyhotoveny mikrosnímky na světelném mikroskopu se zvětšením 100x. V každém odběru bylo v plánu hodnotit minimálně 10 zástupců kvalitních raných embryí, které by se mohly následně v programu Image J vyhodnocovat. Bylo třeba obrázky upravit tak, aby bylo z čeho číst data, odlišit měřené struktury od pozadí, to bylo zprostředkováno pomocí tzv. prahování, které převede původní obraz na obraz binární (obr. 7.3.3.2.1). Následně je pak vyhodnocena plocha části meristemické a plocha části suspenzorové dle postupu uvedeného v Albrechtová a Kubínová (2013).

Box 7.3.3.2.1: Popis přípravy obrázků pomocí programu Image J:

Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov>) je volně dostupný program pro zpracování a analýzu obrazu. Má otevřený software (open source) a protože je založený na programovacím jazyku JAVA, je možné jej používat na různých operačních systémech. Také je do něj možné volně implementovat nově naprogramované moduly.

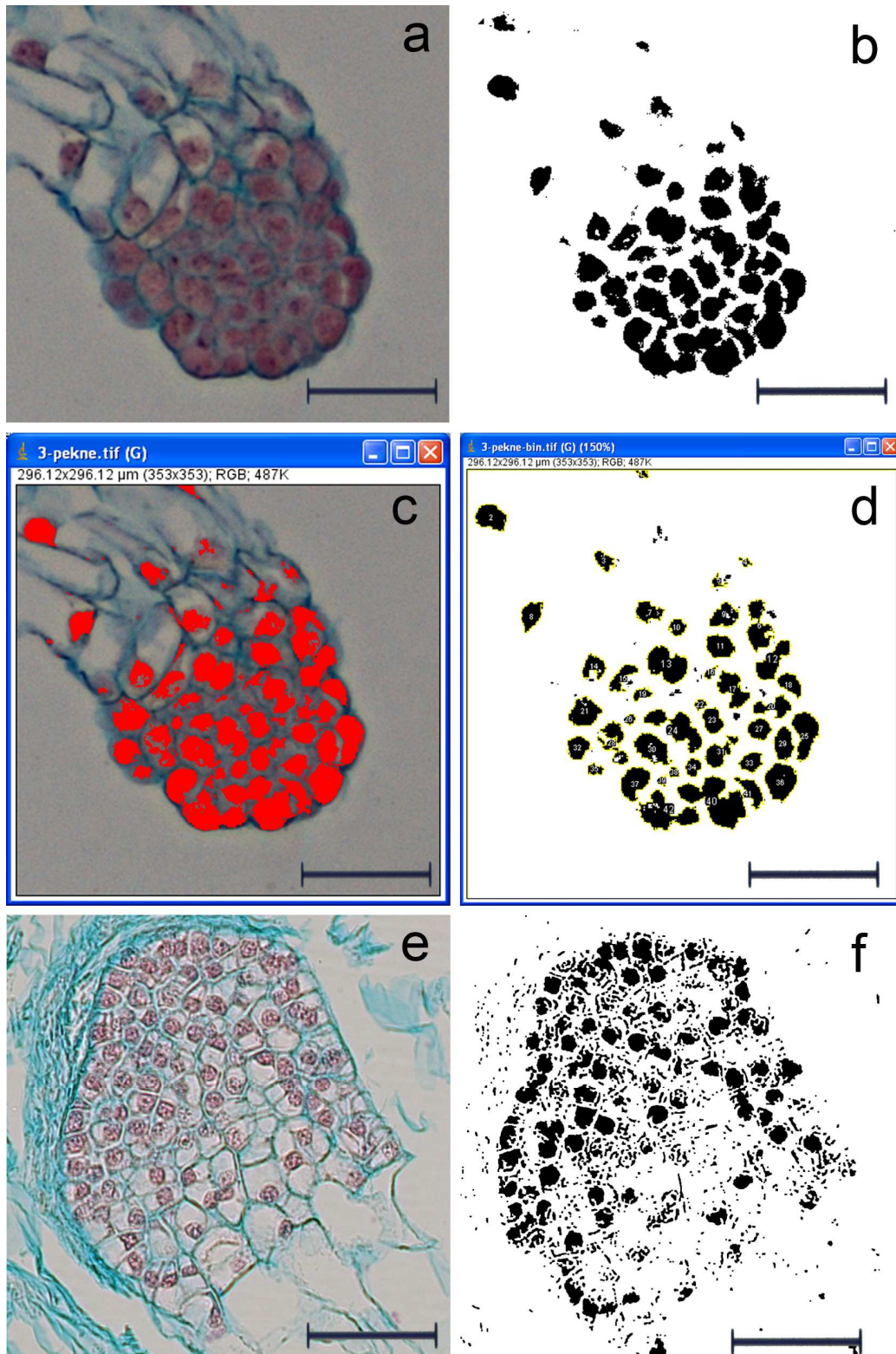
Postup vyhodnocování počtu jader v kvalitním raném somatickém embryu pomocí programu Image J byl připraven na základě textu (Albrechtová a Kubínová, 2013) ve spolupráci se Zuzanou Kubínovou.

Prahování:

- otevřít obrázek v programu Image J
- dát příkaz Image/Adjust/ Threshold
- v okně Threshold Color upravit Hue (odstín), Saturation (sytnost) a Brightness (jas) až jsou označena právě jenom jádra
- v okně Threshold Color stisknout Select, následně Sample

Úprava obrazu pro měření:

- příkazem Process/Binary/Make binary vytvořit binární obraz
- příkazem Process/Binary/ Fill holes můžeme vyplnit útvary v obrázku
- pomocí tužky (Pencil Tool) od sebe můžeme oddělit útvary, které se nepovedlo narahovat odděleně
- v okně Analyze/Analyze Particles můžeme z měření vyloučit drobné objekty, zavedeme-li minimální velikost měřených objektů v nabídce Size, dále zaškrtneme Display results a Add to Manager a potvrdíme
- v okně Results se nám objeví v prvním sloupci počet objektů a v dalších sloupcích jejich vybrané charakteristiky (lze nastavit v Analyze/Set Measurements)
- v okně ROI Manager můžeme dále pracovat s vybranými objekty (např. odstranit z vyhodnocování jádra ležící mimo meristemickou oblast)



Obr. 7.3.3.2.1: Ukázka naprahování meristematické oblasti kvalitního raného somatického embrya: **a** snímek pořízený ve světelném mikroskopu na zvětšení 100x, **b** binární obraz vytvořený programem Image J, **c**, **d** naprahovaný snímek, u kterého je možné určit počet jader v meristematické oblasti pomocí programu Image J, **e** snímek pořízený ve světelném mikroskopu na zvětšení 100x, **f** naprahovaný binární obraz vytvořený v programu Image J, barvení: pravá jádrová červeně a alcianová modř. Úsečka odpovídá délce 400 μm .

8. VÝSLEDKY

8.1. Kvantitativní parametrizace meristemické části

Nejprve bylo nutné připravit vhodnou metodiku, byla připravena metodika, která je poměrně standardní pro odhad poměrného zastoupení anatomických struktur embryogenní kultury s použitím bodové metody (Weibel, 1979). Tuto metodu je možno s výhodou uplatnit s použitím softwaru Ellipse.

Pro zhodnocení struktury kvalitních raných somatických embryí jsme se rozhodli použít analýzu obrazu. Za tímto účelem jsme upravili metodiku pro zpracování a analýzu obrazu, hodnocení pomocí naprahování jader.

Nicméně jak je ukázáno v následné části kategorie kvalitní rané embrya je sama o sobě velmi málo zastoupena, což už v prvopočátku představovalo problém s nalezením 10 kvalitních embryí v každém odběru, které by byla nafocena v mediální řezové rovině.

Zjišťovala jsem, zda bude možné naprahovat buněčné stěny a jádra, tím by se potom mohlo měřit poměrné zastoupení jader v buňkách meristemických oblastí.

Nicméně bylo pozorováno, že u tohoto prahování záleží již velmi na vstupních snímcích. Zjistila jsem rozdílné možnosti v naprahování u snímků, které byly pořízeny na řezech jež byly barveny rozdílnými barvami, co do čerstvosti namíchané barvy se týká. Jak je patrné na obrázku č. 7.3.3.2.1abcd embryo nabarvené čerstvější barvou šlo lépe naprahovat, ale zase se vyskytl problém s tím, že se jednotlivé jádra slévaly dohromady (obr. 7.3.3.2.1c). Na rozdíl od toho na obrázku č. 7.3.3.2.1ef, na kterém je embryo nabarveno starší barvou se jádra při naprahování neslávala, ale nebyla v binárním obrazu celoplošně probarvena.

Závěrem toho tedy je, že měření plochy jader v buňce pomocí naprahování u somatických embryí se nepodařilo zdárně dořešit, ovšem bylo by možné určit počet jader nalézající se v oblasti meristemické hlavy somatického embrya pomocí programu Image J, jak je ukázáno na obrázku č. 7.3.3.2.1d.

Podařilo se tedy tuto metodiku vypracovat, ale z časových důvodů a výše popsaných dalších důvodů se nepodařilo tuto část již zpracovat.

8.2. Stanovené strukturální kategorie

Cílem práce bylo zjistit a popsat vliv nově popsaných aromatických cytokininů na indukci a následný vývoj raných somatických embryí smrku ztepilého. Konkrétně byl použit meta-topolin a jeho vliv byl srovnáván s vlivem běžně používaného cytokininu BAP.

Hlavním z určujících faktorů kvalitního vývoje je to, jaký má daná kultura embryogenní potenciál na použitém médiu, neboli jaké množství kvalitních meristemických struktur se v kultuře vyskytuje.

Na základě morfologického hodnocení řezů (viz kap. 7. Materiál a metody) embryonálně suspenzorovou hmotou v proliferační fázi vývoje jsem stanovila celkem šest kategorií jednotlivých struktur, které se v kultuře vyskytují. Jejich popis a definování je v následujícím textu, ke každé z nich je přiřazeno vždy několik fotografií. Kategorií bylo původně stanoveno více a následně došlo ke sloučení některých dohromady.

Jednotlivé kategorie jsou podrobně definované a popsány níže. Nadefinované kategorie jsou:

- A) kvalitní rané somatické embryo
- B) živá meristemická hmota
- C) polyembryonie
- D) degenerující meristemická struktura
- E) suspenzorová hmota
- F) mrtvé suspenzorové buňky

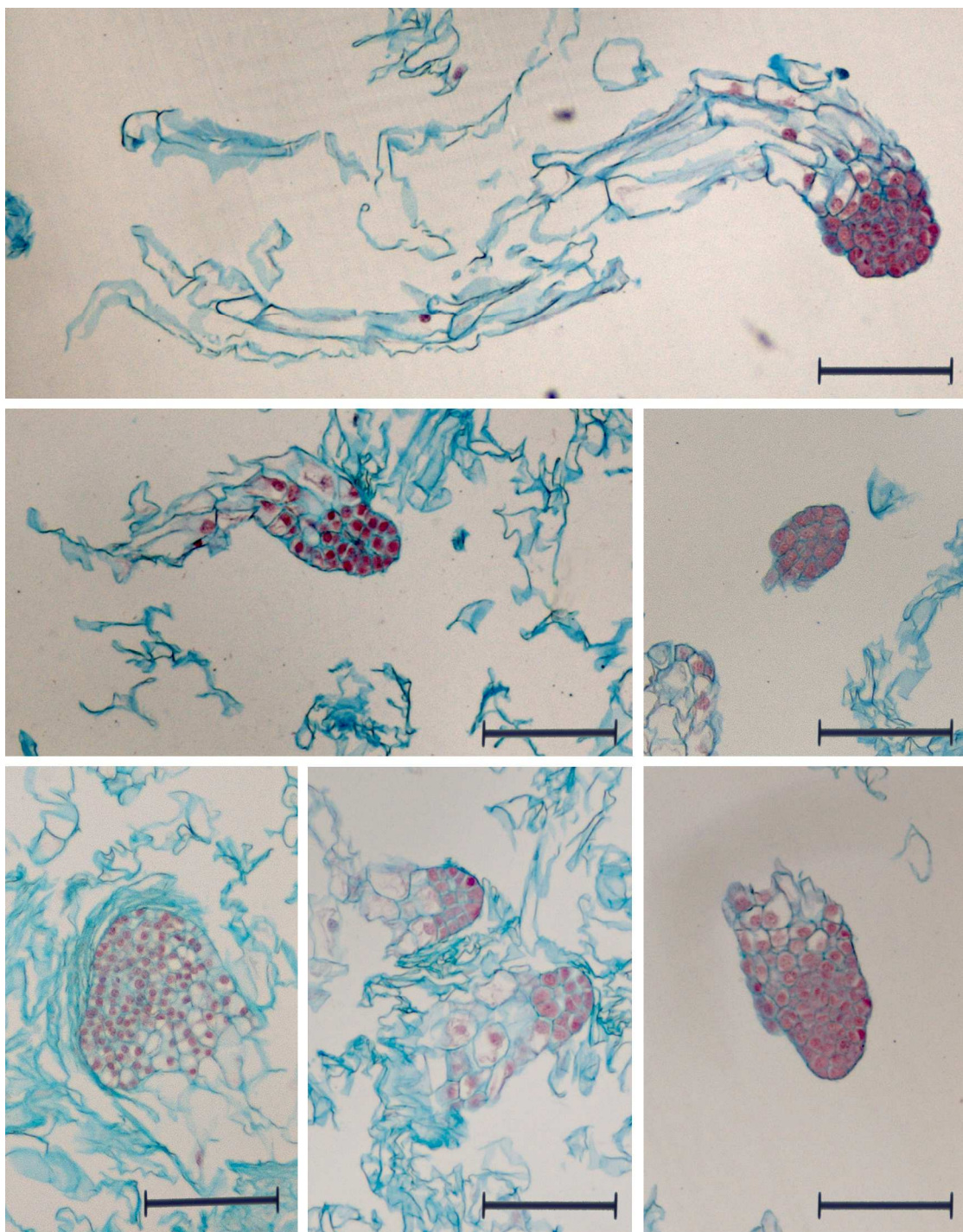
8.2.1. Pravidelné somatické embryo = kvalitní rané somatické embryo

Jednalo se o pravidelné rané somatické embryo typického tvaru a struktury. Byla to typicky bipolární struktura, která se na jedné straně skládala ze shluku meristemických buněk (apikální část), na kterou na bazální straně navazovaly podlouhlé buňky suspenzoru. Buňky suspenzoru byly vysoce vakuolizované. Meristemické buňky hlavičky kvalitního raného embrya byly malé a jejich obsahem bylo velké jádro, které tvořilo většinu vnitřního prostoru buňky. Naopak výskyt buněk s hustou cytoplazmou byl mezi buňkami suspenzoru velmi vzácný. Pro kvalitní rané somatické embryo je také typické, že jeho meristemická hlava má hladký povrch a jasně patrný obrys.

Popsaný typ raného embrya je ideálním stavem, je nutné podotknout, že nalezení takového embrya na řezech kulturou bylo velmi vzácné. Jedná se totiž o případ, kdy se nám podařilo embryo říznout v mediální rovině (obr. 8.2.1.1). Je jasné, že kvalitních embryí je v kultuře mnohem více než pouze pozorované případy. Orientace bločků pro tvorbu řezů (a umístění raných somatických embryí v rámci embryonálně suspenzorové hmoty) je náhodné. Následné snímání řezů pro obrazovou analýzu je také náhodné, tak se většinou nepodařilo embrya nařezat a zobrazit v této ideální pozici mediálního řezu. Mohou nastat případy, kdy bude embryo říznuto a nasnímáno v pozici jiné, například bude říznuta pouze meristemická hlava. Proto do této kategorie spadají také embrya, která mají jasně bipolární charakter, ale byla říznuta v rovině vodorovné s mediální rovinou. U těchto struktur pak může být hlava meristemických buněk tvořena buňkami, které nejsou tak hodně vyplněné jádry, v tomto případě se totiž jedná o buňky, které se nacházejí více na kraji hlavy, tudíž nejsou úplně stejné jako ty, které jsou uvnitř meristemické hlavy embrya. Na základě pozorování sériových řezů, pokud na takovou strukturu navazovaly buňky suspenzoru, byla zařazena do této kategorie (obr. 8.2.1.1).

Do této kategorie jsem zařadila také meristemické útvary, které byly kulovitěho tvaru, měly hladký a jasný obrys. Samozřejmě pro ně bylo charakteristické, že jejich meristemické buňky byly malé, navzájem velmi blízko sebe a jejich obsah tvořila velká jádra (obr. 8.2.1.1). U těchto útvarů se jedná o případy, kdy rovina řezu projela skrz hlavu pod jiným úhlem, než aby strefila mediální rovinu, či rovinu s ní vodorovnou (řezy embryem byly šikmé).

Tato kategorie je výběr těch nejhezčích a nejkvalitnějších embryí, nacházejících se v kulturách. U tohoto „top“ výběru se předpokládá další růst a potenciální vývoj v dalších fázích procesu somatické embryogeneze.



Obr. 8.2.1.1: Příklady kvalitních raných somatických embryí *P. abies* v proliferační fázi. Barvení: alcianová modř a pravá jádrová červeň. Meristematická pletiva s velkými jádry a hustou cytoplazmou se barví červeně, buněčné stěny modře. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

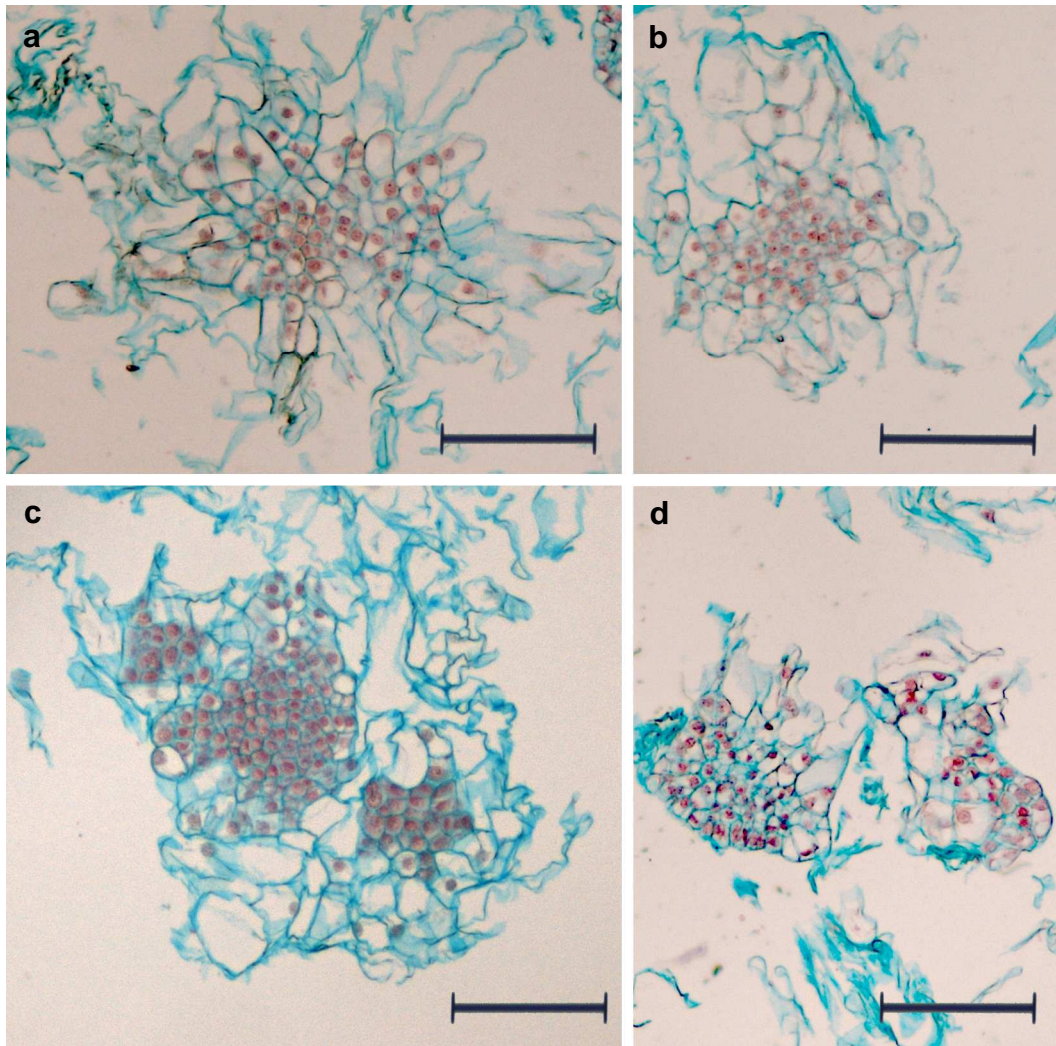
8.2.2. Živá meristemická hmota

Do této kategorie spadají struktury vysoce meristemické, u kterých je na první pohled jasné, že se nejedná o kvalitní embrya (tedy předchozí kategorii), ale přesto mají embryogenní potenciál. Anebo struktury, u kterých jsem si ani na základě pozorování sériových řezů nebyla jistá, že to jsou kvalitní raná embrya.

Spadají sem i například tzv. slunečkovité struktury. Tyto paprscité útvary mají meristemickou oblast, velmi často kruhového či elipsovitého průřezu. I tyto meristemické buňky jsou naplněny jejich jádry, ale suspenzorové buňky tentokrát odstupují od meristemického shluku ve všech směrech (obr. 8.2.2.1ab).

Intenzita výskytu těchto struktur je zřejmě odlišná u jednotlivých kultur. U námi použité kultury 34C, byly tyto struktury poměrně časté a to především v prvním odběru, častěji jsem je pozorovala u kultury rostoucí na meta-topolinu. Naopak u kultury 107 tyto struktury nebyly téměř pozorovány.

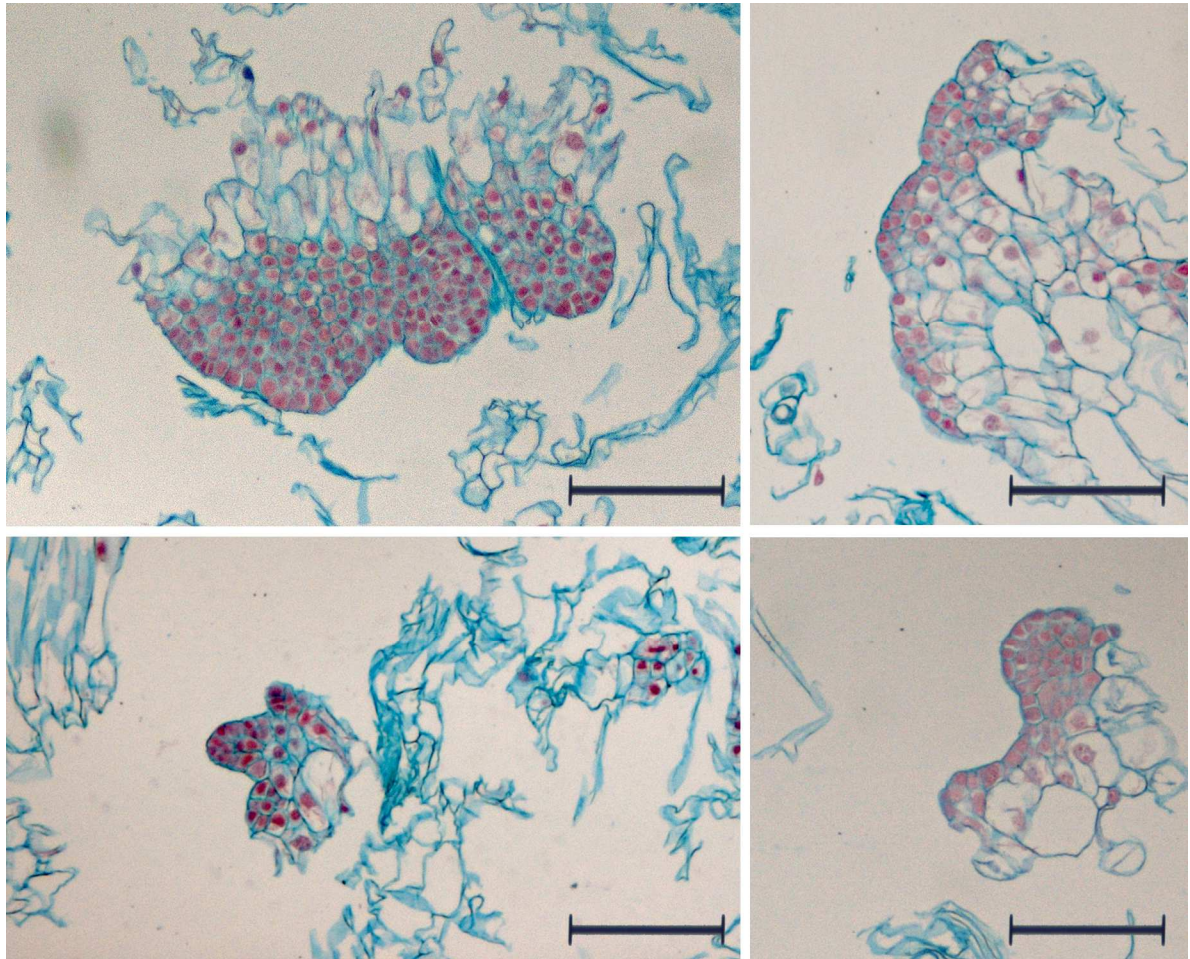
Dále pokud křížek v bodové mřížce programu Ellipse padl přesně na meristemickou buňku, která nebyla s žádnou další strukturou spojena, potom také tato buňka byla zařazena do této kategorie. Do této kategorie spadají také všechny struktury, které není možné jinak zařadit, ale přesto mají typické meristemické buňky s hustou cytoplazmou. Jedná se především o neorganizované struktury (obr. 8.2.2.1cd).



Obr. 8.2.2.1: Příklady struktur z kategorie živá meristematická hmota – *P. abies* v proliferační fázi. **a,b** slunečkovité útvary, **c,d** neurčité meristematické struktury. Barvení: alciánová modř a pravá jádrová červeně. Meristematická pletiva s velkými jádry a hustou cytoplazmou se barví červeně, buněčné stěny modře. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

8.2.3. Polyembryonie

Štěpná polyembryonie byla v kulturách somatických embryí jehličnanů poprvé popsána již před mnoha lety (např. Hakman a von Arnold, 1988). Polyembryonie je jev, při kterém vzniká několik embryí z jediné embryonální struktury/embrya. Takto vzniklá somatická embrya mají jeden společný suspensor. Je to vlastnost kultur běžně pozorována během prvotních fází somatické embryogeneze nejen u smrku, ale i u jiných druhů jehličnanů. Z důvodu častého výskytu byla v mé práci vymezena samostatná kategorie pro tuto strukturu (obr. 8.2.3.1).



Obr. 8.2.3.1: Polyembryonie – *P. abies* v proliferační fázi. Barvení: alciánová modř a pravá jádrová červeň. Meristematická pletiva s velkými jádry a hustou cytoplazmou se barví červeně, buněčné stěny modře. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

8.2.4. Degenerující meristematická struktura

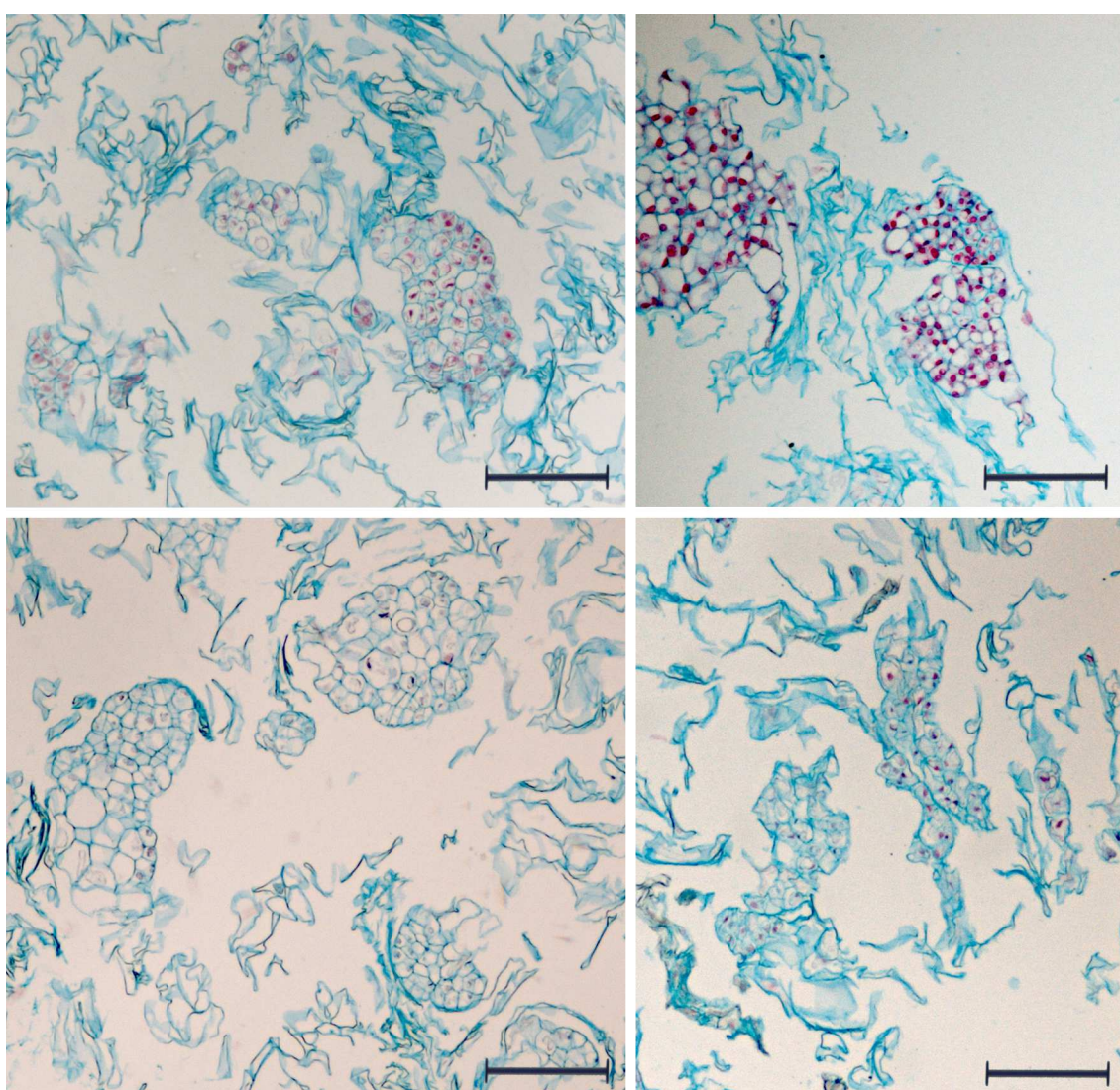
Do této kategorie spadají struktury, u kterých je patrné, že to původně byla struktura meristematického charakteru, nicméně v době odběru docházelo uvnitř meristematických buněk již k degeneraci. Tento jev se projevuje především narušením jádra meristematických buněk. Celkově jsou buňky větší. V některých případech je patrné ještě červeně nabarvené jádro, ale již se zdá, že je porušená jeho celistvost (obr. 8.2.4.1). Zároveň s vytvořením této kategorie byl proveden i orientační test viability, prokazující, že se nejednalo o struktury mrtvé.

Velmi často se vyskytují struktury, u nichž je jasné, že to byla kvalitní raná embrya, mají hladce ohraničenou apikální část, ale uvnitř jejich buněk již nejsou patrná červeně nabarvená jádra (obr. 8.2.4.1).

Je možný samozřejmě i případ, kdy v jedné struktuře jsou zároveň buňky živé s hustou cytoplazmou a jádrem, a buňky, které již jádro nemají. To ukazuje na postupující degradaci těchto meristemických struktur (obr. 8.2.4.1).

Pozorovatelný je rozdíl v probarvení jader pomocí pravé jádrové červeně, jádra degenerujících buněk jsou o několik odstínů tmavěji nabarvená než jádra živé meristemické hmoty, či kvalitních raných somatických embryí.

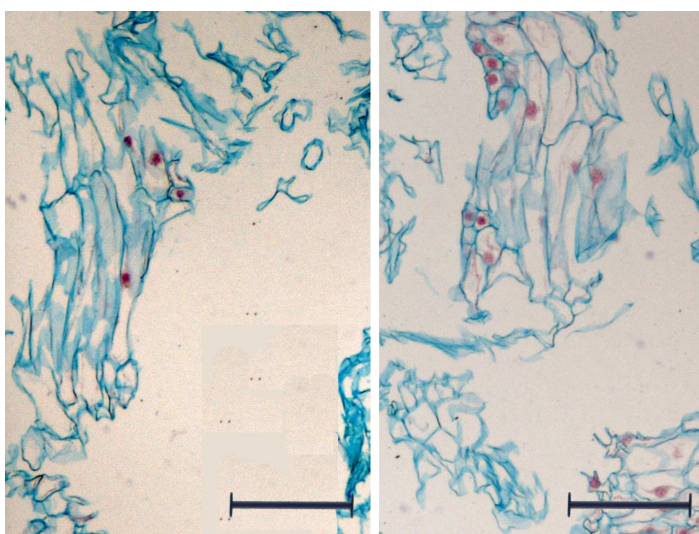
Výskyt struktur této kategorie byl v jednotlivých odběrech velice častý, dokonce mnohdy převyšoval svým procentuálním zastoupením ostatní meristemické kategorie (podrobněji viz následující podkapitola).



Obr. 8.2.4.1: Příklady struktur z kategorie degenerující meristemická struktura – *P. abies* v proliferační fázi. Pozorovatelný je rozdíl v probarvení jader pomocí pravé jádrové červeně, jádra degenerujících buněk jsou o několik odstínů tmavěji nabarvená než jádra živé meristemické hmoty, či kvalitních raných somatických embryí. Barvení: alciánová modř a pravá jádrová červeně. Meristemická pletiva s velkými jádry a hustou cytoplazmou se barví červeně, buněčné stěny modře. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

8.2.5. Suspenzorové buňky

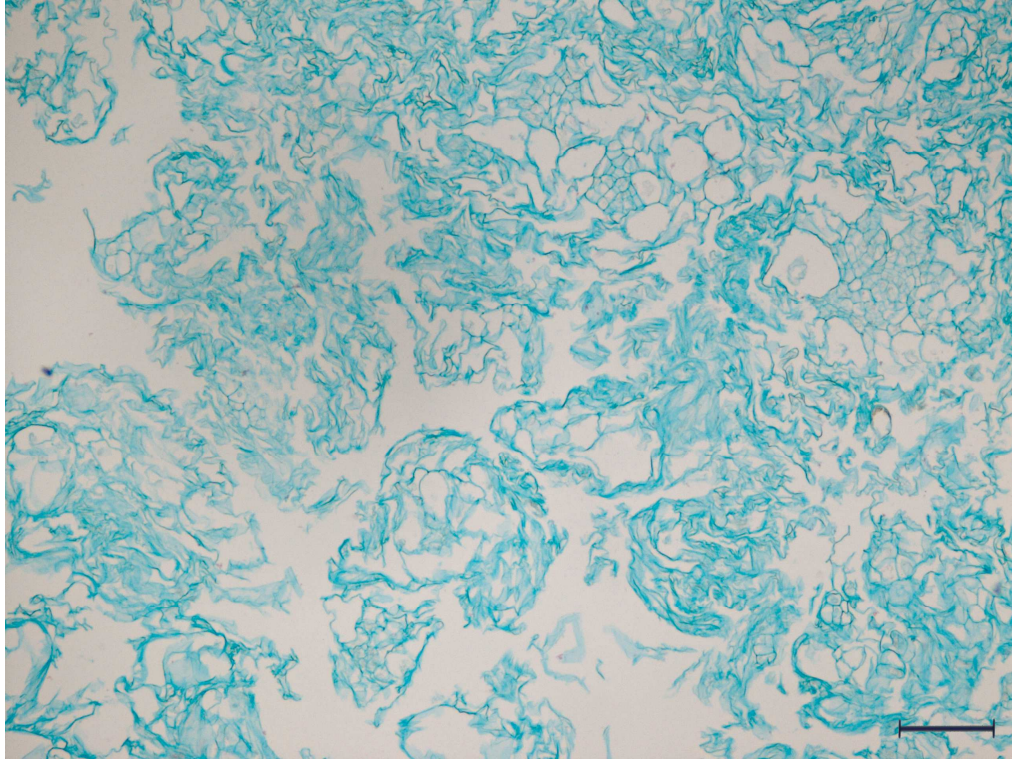
Do této kategorie spadaly zřetelně rozpoznatelné suspenzorové oblasti, které ovšem nijak nenavazovaly na meristematické hlavy embryí (obr. 8.2.5.1), ani při orientačním vyhledávání v navazujících sériových řezech. Je možné předpokládat, že tyto struktury v průběhu zpracování a tvorby řezů se odpoutaly od svých meristematických oblastí. Během zpracování v programu Ellipse se ukázalo, že se tyto struktury vyskytují velice zřídka. Prakticky byly pozorovány pouze v jediném odběru (třetí odběr u kultury 107, kultivovaném na BAP). Proto byla tato kategorie zrušena a sloučena s následující kategorií (kategorie mrtvé suspenzorové buňky).



Obr. 8.2.5.1:
Příklady suspenzorových buněk *P. abies* v proliferační fázi. Barvení: alciánová modř a pravá jádrová červeň. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

8.2.6. Mrtvé suspenzorové buňky

Do této kategorie spadají modře nabarvené oblasti – celulózní buněčné stěny, uvnitř kterých není pozorovatelný žádný buněčný obsah. Jedná se o mrtvou hmotu, která odpadla od embryogenních struktur při postupném zpracování vzorků a následné tvorbě parafinových řezů. Tato hmota není výrazně organizovaná. Bylo ovšem možné pozorovat rozdíly v četnosti výskytu této hmoty v jednotlivých odběrech. U některých odběrů zaujímal velké procento výskytu, téměř nezbylo žádné bílé pozadí na řezech, naopak u jiných odběrů byla kultura rozvolněnější (obr. 8.2.6.1).



Obr. 8.2.6.1: Příklad hmoty spadající do kategorie mrtvé suspenzorové buňky, mezi kterými jsou patrné oblasti degenerujících meristemických struktur. *P. abies* v proliferační fázi. Barvení: alcianová modř a pravá jádrová červeň. Nepřítomnost červených struktur implikuje nepřítomnost buněčného obsahu s jádry. Celulozní buněčné stěny se barví modře. Úsečka odpovídá délce 200 μm .

8.3. Hodnocení poměrného zastoupení embryogenních struktur

Na trvalých preparátech, které byly zhotoveny (viz kap. 7. Materiál a metody), bylo měřeno poměrné zastoupení typicky se vyskytujících struktur v embryogenní kultuře. Jednotlivé kategorie jsou podrobně definované a popsány v předešlé podkapitole (kap. 8.2), a to: kvalitní rané somatické embryo, živá meristemická hmota, polyembryonie, degenerující meristemická struktura, suspenzorová hmota a mrtvé suspenzorové buňky. Jako další kategorie se vyskytuje v některých grafech kategorie "bílé místo", to nám dává představu o tom, jak byla embryonálně suspenzorová hmota rozvolněná v okamžiku zpracování.

Jako experimentální faktor byl sledován vliv složení média a to byly dva případy, kultura pěstovaná na proliferačním médiu s přidáním *mT* a kultura pěstovaná na proliferačním médiu obsahující BAP, tato kultura sloužila jako kontrola, jelikož je BAP běžně používaný již řadu let. Odběry na obou kulturách byly prováděny vždy současně.

Následně jsou uvedeny zjištěné výsledky, postupně nejprve na kultuře 107 (studované jako první), poté na kultuře 34C (druhé studované). Podrobnější popis kultur viz kapitola 7. Materiál a metody. Závěrem jsou pak výsledky porovnány pro studované linie současně, kdy embryogenní linie představuje další faktor pokusů.

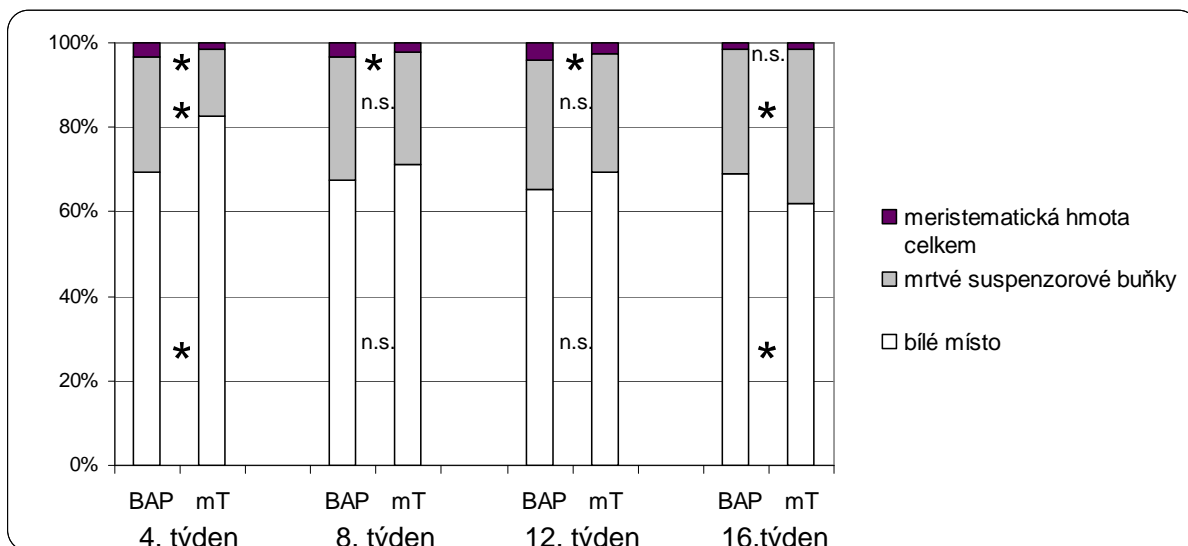
8.3.1. Kultura 107

U kultury 107 byly provedeny celkem čtyři odběry v proliferační fázi.

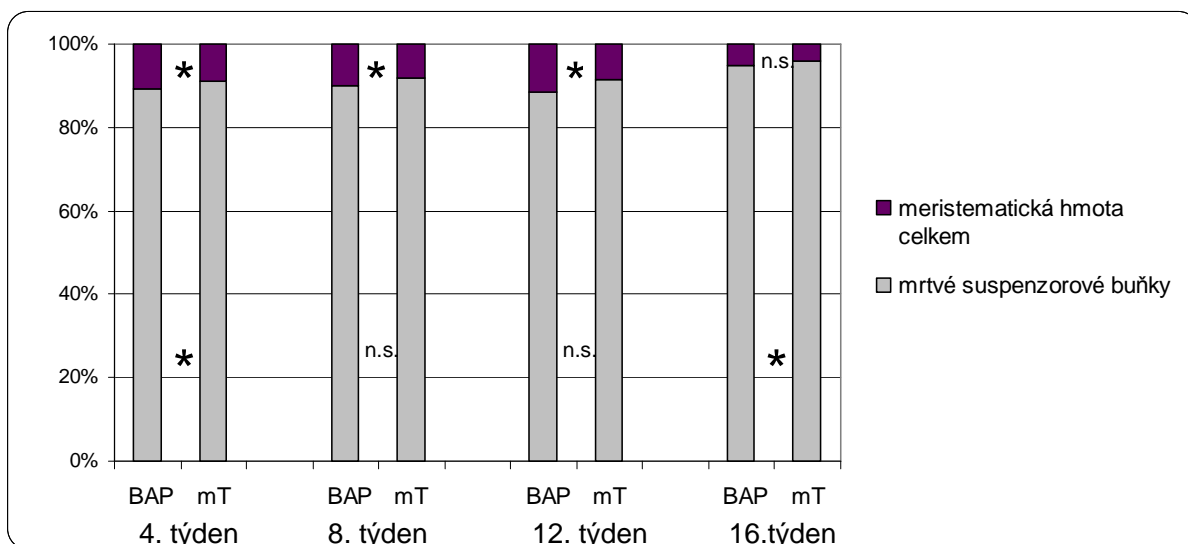
Graf 8.3.1.1 porovnává vždy mezi sebou odběr na BAP a *mT* ve stejném čase. Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech struktur (všechny kategorie) včetně bílého místa. Meristemická hmota celkem obsahuje všechny meristemické kategorie, včetně degenerujících meristemických struktur (kap. 8.2). Velmi dobře je z grafu patrné, že meristemické struktury, tvořily pouze zlomek z celku. Mezi jednotlivými odběry nebyly zaznamenány nijak výrazné rozdíly. Rozdíly v jednotlivých odběrech mezi zvoleným hormonem, byly statisticky významné především u meristemických struktur, které jsou pro nás nejvíce zajímavé, ukazují jak se daná kultura embryogenní. Lepších výsledků dosahovala varianta s BAP, nemusí to, ale znamenat, že je toto ošetření kvalitnější.

Graf 8.3.1.2: V tomto grafu představují 100 % všechny kategorie ovšem bez bílého místa. Z grafu je patrné, že si obě kultury zachovávají podobný rozptyl po celou dobu zkoumání. Kultura s *mT* obsahuje menší procentuální zastoupení meristemických struktur než varianta s přidáním BAP. Ve čtvrtém odběru již tento rozdíl není statisticky průkazný.

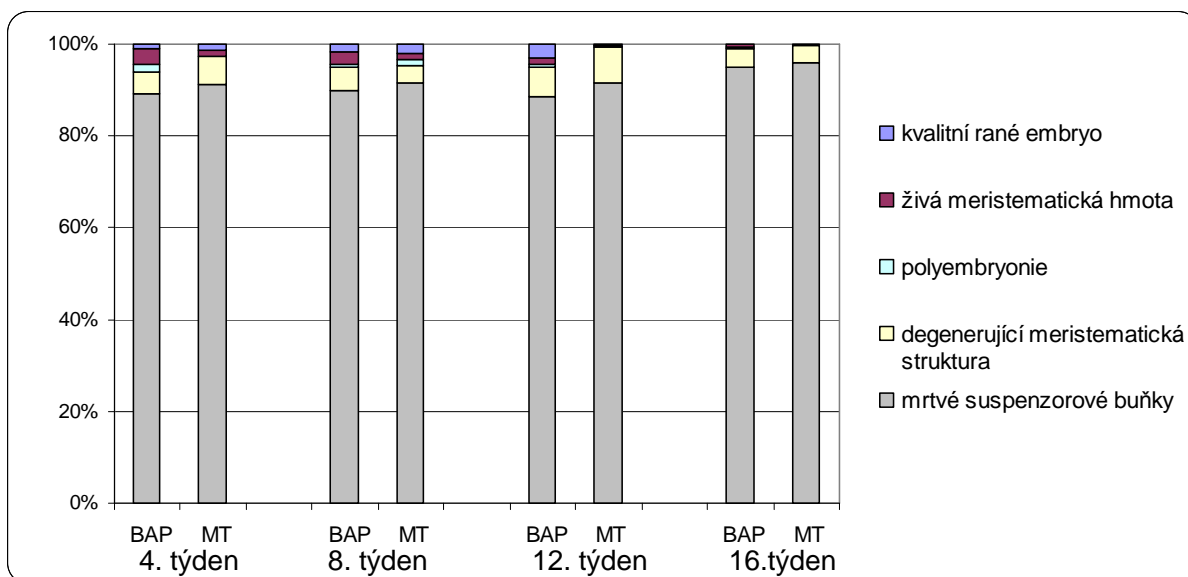
Graf 8.3.1.3 je velmi podobný předešlému grafu. Ovšem v tomto grafu jsou všechny kategorie vyjádřeny zvlášť, je tedy patrné jakou část z celku jednotlivé meristemické struktury tvoří. Nejvíce nás zajímala kategorie kvalitní raná somatická embrya, tyto struktury tvoří maximálně 2 % ze všech pozorovaných struktur. V některých odběrech téměř chybí.



Graf 8.3.1.1: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech strukturálních kategorií včetně bílého místa. Meristemická hmot celkem zahrnuje: kvalitní raná embrya, živou meristemickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristemické struktury. Porovnání varianty s BAP a s mT, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.1.2: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa. Meristemická hmot celkem zahrnuje: kvalitní raná embrya, živou meristemickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristemickou strukturu. Porovnání varianty s BAP a s mT, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



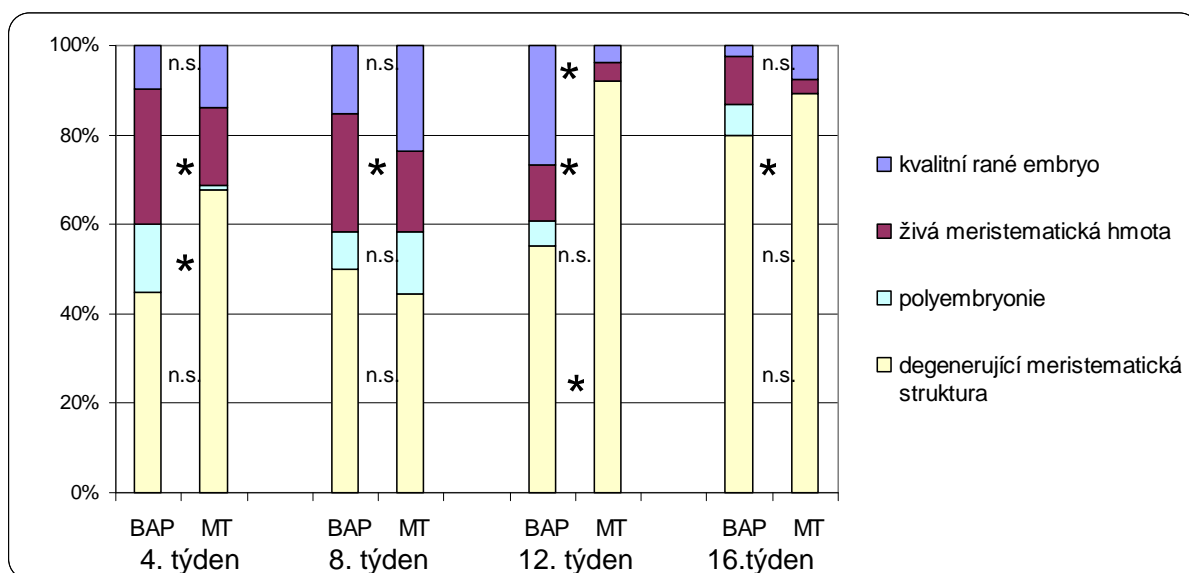
Graf 8.3.1.3: Poměrné zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferační kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa. Porovnání varianty s BAP a s mT, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace.

Graf 8.3.1.4 je nejvíce zajímavým, ukazuje rozdíly mezi oběma variantami (BAP a mT), 100 % je v tomto případě tvořeno již pouze jednotlivými kategoriemi meristematických struktur. Vynechána byla oproti předešlým grafům kategorie mrtvé suspenzorové buňky. Jak již bylo řečeno, meristematické struktury jsou pro nás ty nejvíce zajímavé a určují kvalitu dané kultury. Z grafu je jasně vidět, že největší podíl má ve všech provedených odběrech kategorie degenerující meristematické struktury a čím se jednalo o pozdější odběr, tím byla tato kategorie více zastoupená. Bylo možné pozorovat ve třech odběrech (1., 3. a 4. odběr), že tato kategorie byla výraznější u varianty s přidáním mT, statisticky průkazného rozdílu bylo, ale dosaženo pouze u odběru ve 12. týdnu. Polyembryonie se častěji vyskytovala u varianty ošetřené pomocí BAP. Nejvíce zajímavou kategorií je zajisté kvalitní rané embryo spolu s kategorií živá meristematická hmota. Bylo jasně pozorováno, že zastoupení obou těchto kategorií s narůstajícím časem odběru klesá. Z toho se dá usuzovat, že tato embryogenní hmota mezi jednotlivými odběry degenerovala. Ve všech odběrech byla živá meristematická hmota více zastoupená u varianty BAP.

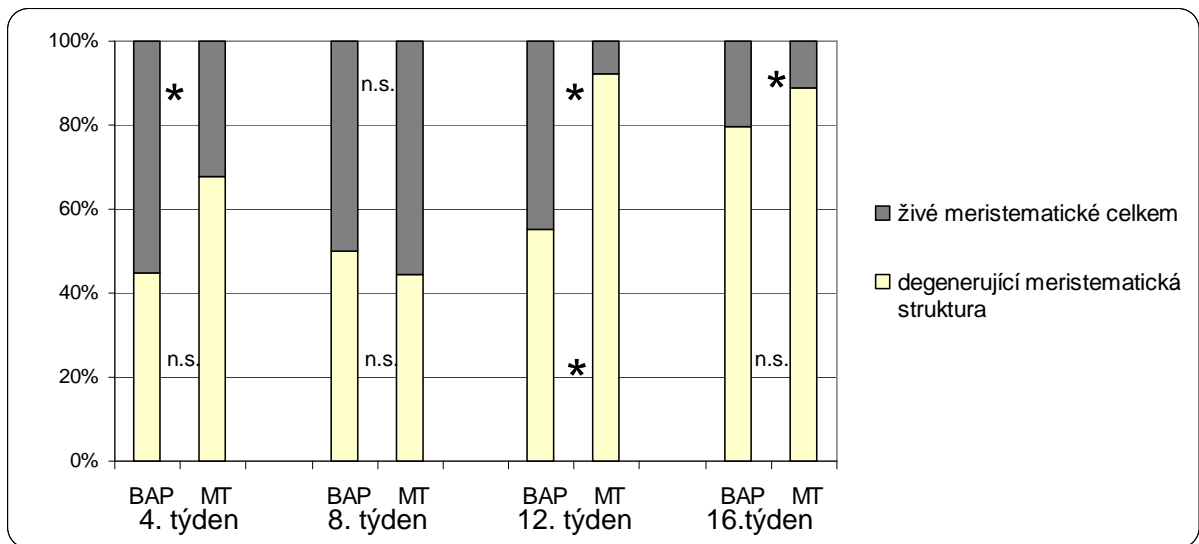
Graf 8.3.1.5 srovnává dvě kategorie, jednou z nich jsou degenerující meristematické struktury a druhá je živá meristematická hmota celkem (tato kategorie zahrnuje: kvalitní raná embryo, polyembryonii a živé meristematické struktury). I v tomto grafu představují 100 % všechny meristematické struktury nacházející se v kultuře. Z grafu je patrné, že varianta

s přidáním BAP si vedla lépe než varianta s *mT*, tedy, že obsahovala méně degenerující meristemické hmoty.

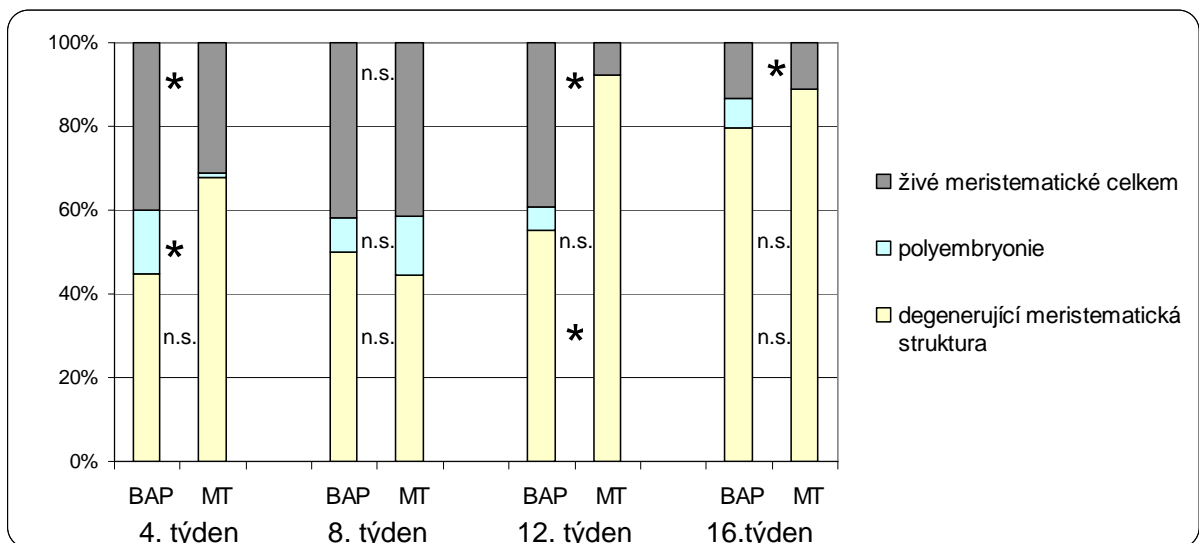
Graf 8.3.1.6 je podobný grafu předešlému, ale vidíme zde poměrné zastoupení polyembryonie v kultuře. Kategorie kvalitní rané somatické embryo a živá meristemická hmota byly sloučeny. Některé struktury z kategorie živá meristemická hmota jsou velmi těžko rozeznatelné a není možné u nich posoudit, zda se nejedná o kvalitní embrya, která jsou ale říznutá v jiné rovině než vodorovné s rovinou mediální (podrobný popis viz kap. 8.2.1 a 8.2.2). Z tohoto grafu je tedy patrné, že polyembryonie není nijak častým jevem u kultury 107, vyskytuje se v procentuálním zastoupení 0-10 % z celkového množství meristemických struktur nacházejících se v kultuře. Statisticky významný rozdíl byl u polyembryonie pozorován pouze v prvním odběru.



Graf 8.3.1.4: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristemických kategorií. Porovnání varianty s BAP a s *mT*, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.1.5: Poměrné zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferující kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Kategorie živá meristematická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristematická hmota. Porovnání varianty s BAP a s *mT*. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.1.6: Poměrné zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferující kultury 107: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Kategorie živá meristematická celkem v tomto případě zahrnuje kvalitní raná somatická embrya a živou meristematickou hmotu. Porovnání varianty s BAP a s *mT*, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.

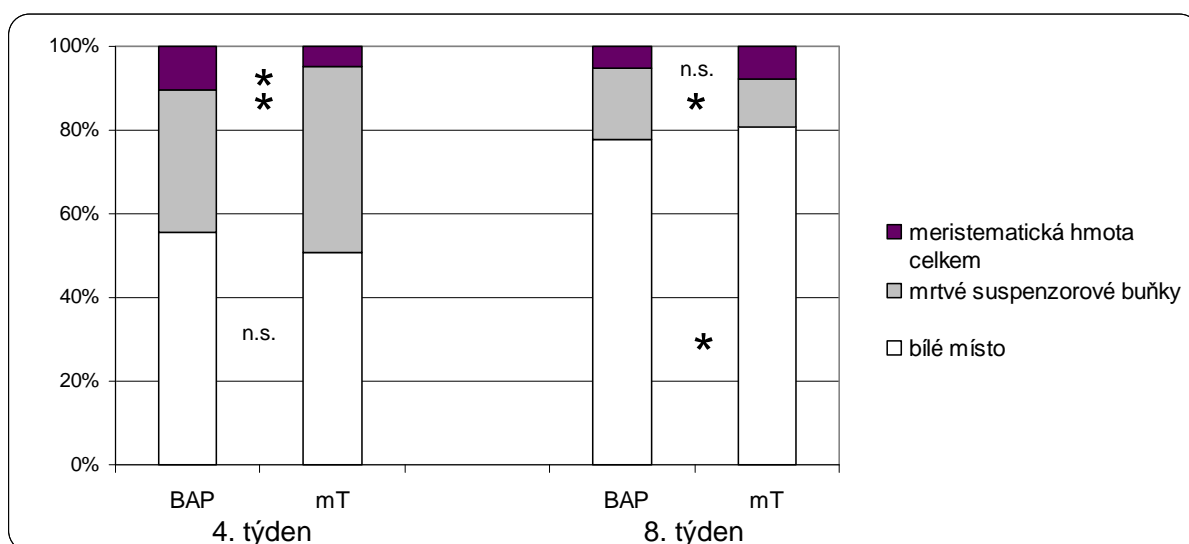
8.3.2. Kultura 34C

U kultury 34C byly provedeny pouze dva úspěšné odběry v proliferační fázi, poté bohužel došlo, během následné kultivace k mikrobiální degradaci veškerého materiálu.

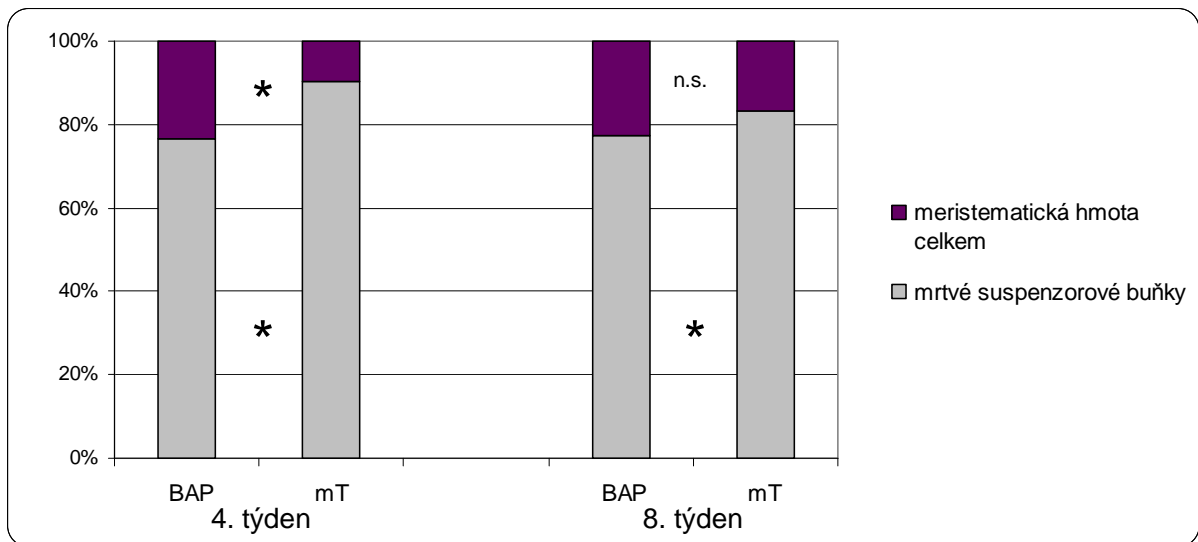
Graf 8.3.2.1 zobrazuje dva odběry, v tomto případě je jakožto 100 % zvolen součet všech definovaných kategorií současně s kategorií bílé místo (podrobný popis kategorií viz kap. 8.2). Bílé místo vyjadřuje prostor, kam padl bod při měření po přiložení mřížky v programu Ellipse, ale žádná buněčná struktura se zde nevyskytovala. Značí nám to, jak byla daná kultura rozvolněná po veškerém zpracování během fixace a následné tvorby trvalých preparátů (viz kap. 7. Materiál a metody). Rozdíly mezi jednotlivými variantami BAP a *mT* jsou statisticky průkazné u kategorie mrtvé suspenzorové buňky u obou odběrů.

Graf 8.3.2.2 popisuje již situaci procentuálního zastoupení bez bílého místa, 100 % je utvářeno kategorií meristematická hmota celkem a mrtvé suspenzorové buňky. Je vidět, že kultura se chovala konzistentně, u obou odběrů byl větší podíl meristematických struktur pozorován u varianty s přidáním BAP, nicméně statisticky průkazné to bylo pouze v prvním odběru.

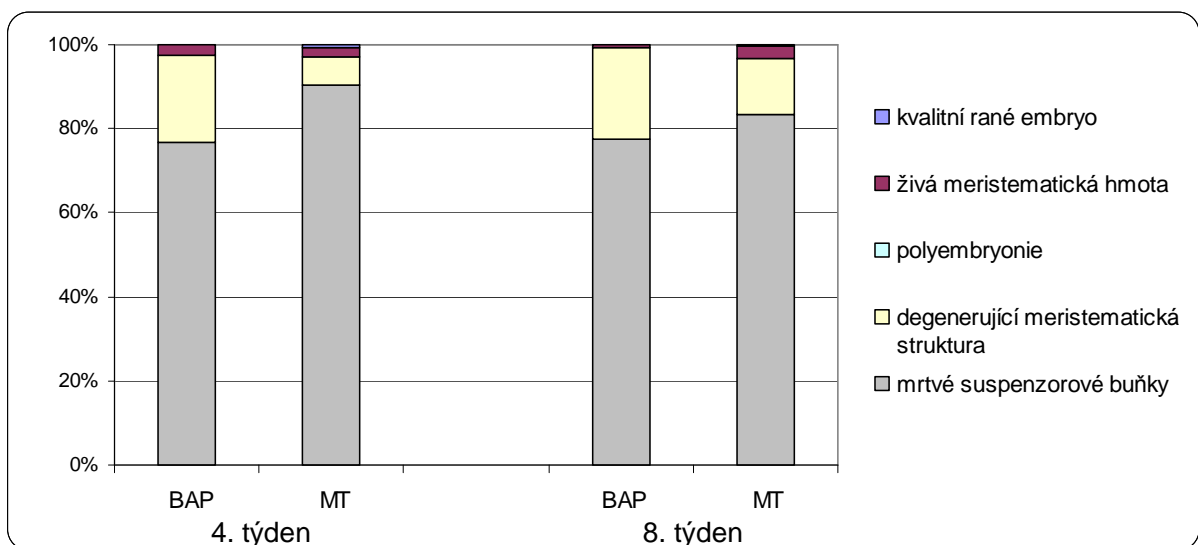
Graf 8.3.2.3 vyjadřuje všechny zastoupené kategorie. Z grafu je patné, že kategorie polyembryonie se nevyskytovala v žádném z odběrů bez ohledu na variantu použitého cytokininu. Lépe bude situace vidět na následujícím grafu.



Graf 8.3.2.1: Poměrné zastoupení meristematické hmoty na řezech prolifерující kultury 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií včetně bílého místa. Meristematická hmota celkem zahrnuje: kvalitní raná embrya, živou meristematickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristematické struktury. Porovnání varianty s BAP a s *mT*, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.2.2: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa. Meristemická hmota celkem zahrnuje: kvalitní raná embrya, živou meristemickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristemickou strukturu. Porovnání varianty s BAP a s mT, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.

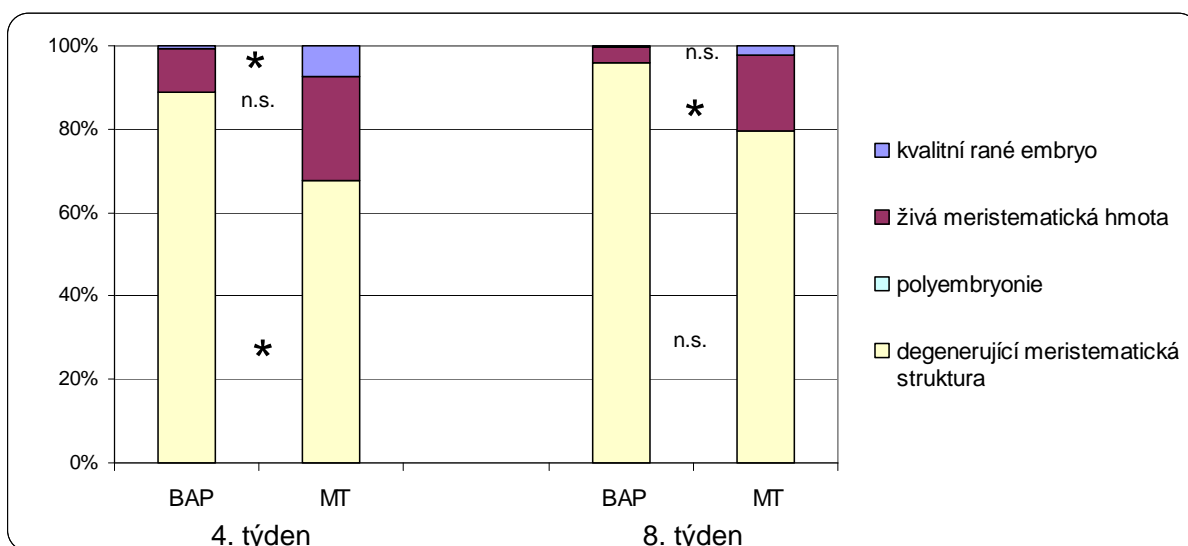


Graf 8.3.2.3: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa. Porovnání varianty s BAP a s mT, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace.

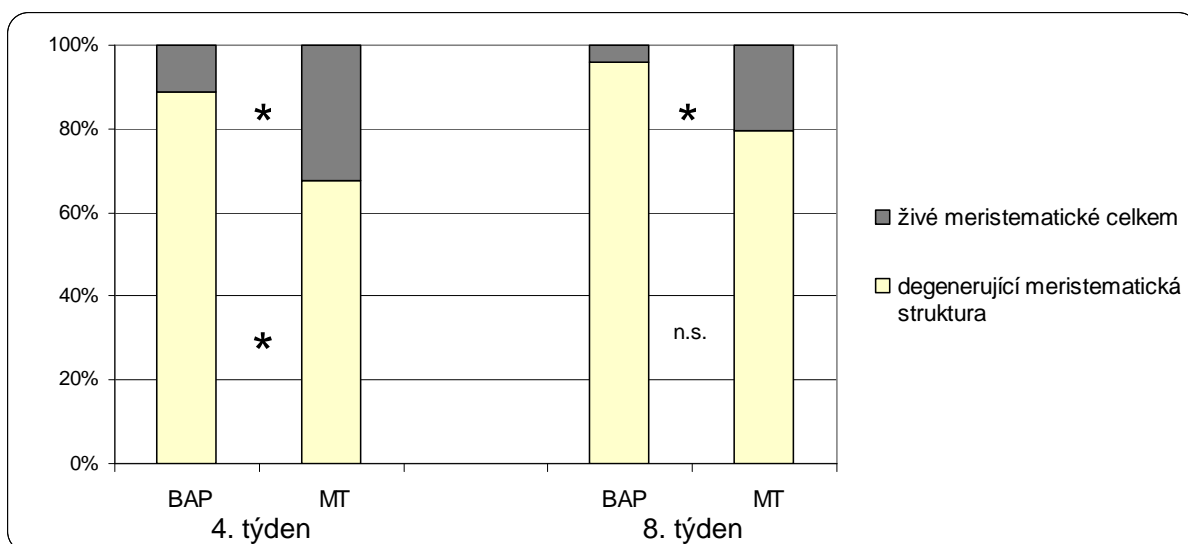
Graf 8.3.2.4 zobrazuje již pouze procentuální zastoupení jednotlivých meristemických kategorií v dané kultuře. Na první pohled je z grafu jasné, že kategorie polyembryonie u kultury 34C zcela chyběla. Přestože z grafu 8.3.2.2 bylo vidět, že varianta s mT má menší zastoupení meristemické hmoty, na tomto grafu je vidět, že je ovšem tvořena především živou meristemickou hmotou nikoliv degenerovanými strukturami. Varianta s přidáním BAP měla větší podíl meristemické hmoty z celku, ale ve velké míře se

jednalo o degenerované meristemické struktury. Jasný rozdíl je také vidět u kategorie kvalitní rané somatické embrya, kde varianta s přidáním *mT* jasně vítězí, ale opět pouze v prvním odběru byla tato skutečnost dostatečně statisticky průkazná.

Graf 8.3.2.5 potvrzuje to co bylo již patrné z předešlého grafu, tedy, že varianta s *mT* má výrazně lepší výsledky ve výskytu živých meristemických struktur než varianta s běžně používaným cytokininem BAP. Polyembryonie se u této kultury vůbec nevyskytovala.



Graf 8.3.2.4: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristemických kategorií. Porovnání varianty s BAP a s *mT*, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.2.5: Poměrné zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferující kultury 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristemických kategorií. Kategorie živá meristemická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristemická hmota. Porovnání varianty s BAP a s *mT*, na ose X jsou uvedeny týdny kultivace. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.

8.3.3. Porovnání kultur 107 a 34C

Porovnání kultur 107 a 34C bylo provedeno u dvou odběrů: 4. a 8. týden kultivace na proliferačním médiu, protože jich u kultury 34C bohužel více nebylo odebráno. Jako testované faktory v procentuálním zastoupení jednotlivých strukturálních kategorií byly 1. Vliv embryogenní kultury a 2. Vliv rozdílného přídatku cytokininu do média a zároveň i provázanost těchto faktorů. Všechny statistické výsledky jsou uvedeny ve dvou přehledných tabulkách (tab. 8.3.3.1 a 8.3.3.2), kvůli provázanosti tohoto hodnocení mezi zvolenou kulturou a hormonem, nemohly být použity statistické symboly v grafech.

odběr 1 - 4. týden kultivace

Faktor	Kvalitní rané embryo	Živá meristemat. hmota	Poly-embryonie	Degenerující meristemat. struktura	Mrtvé suspensor. buňky	Bílé místo	Živá meri. hmota celkem
A: Hormon	n.s.	n.s.	0,001550*	0,000000*	n.s.	0,002816*	n.s.
B: Kultura	n.s.	0,041465*	0,000731*	0,000000*	0,000000*	0,000000*	n.s.
AB	0,015181*	n.s.	0,001550*	0,000000*	0,000000*	0,000000*	0,005254*

$\alpha=0,05$

Tab. 8.3.3.1: Statistické vyhodnocení dvouvýběrové ANOVA ukazující rozdíly v poměrném zastoupení jednotlivých stanovených kategorií v závislosti na zvolené kultuře a zvoleném hormonu. Jedná se o první odběry sledovaných kultur 107 a 34C, což odpovídalo 4. týdnu kultivace na proliferačním médiu.

odběr 2 - 8. týden kultivace

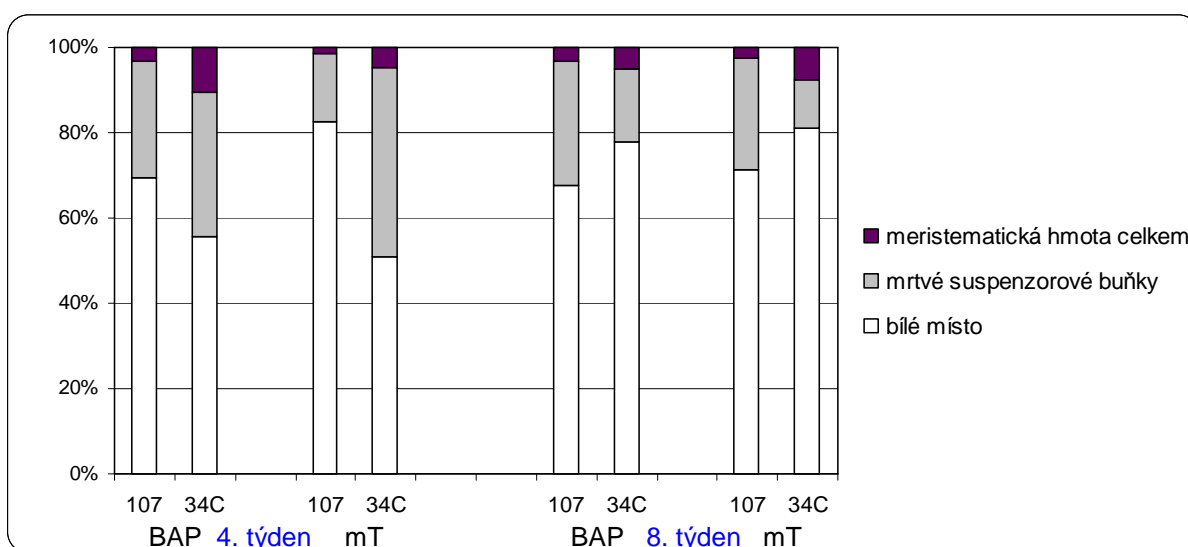
Faktor	Kvalitní rané embryo	Živá meristemat. hmota	Poly-embryonie	Degenerující meristemat. struktura	Mrtvé suspensor. buňky	Bílé místo	Živá meri. hmota celkem
A: Hormon	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,000055*	0,000258*	n.s.
B: Kultura	0,000000*	n.s.	0,000137*	0,000065*	0,001328*	n.s.	0,000811*
AB	n.s.	0,000065*	n.s.	n.s.	0,000000*	0,000000*	0,002923*

$\alpha=0,05$

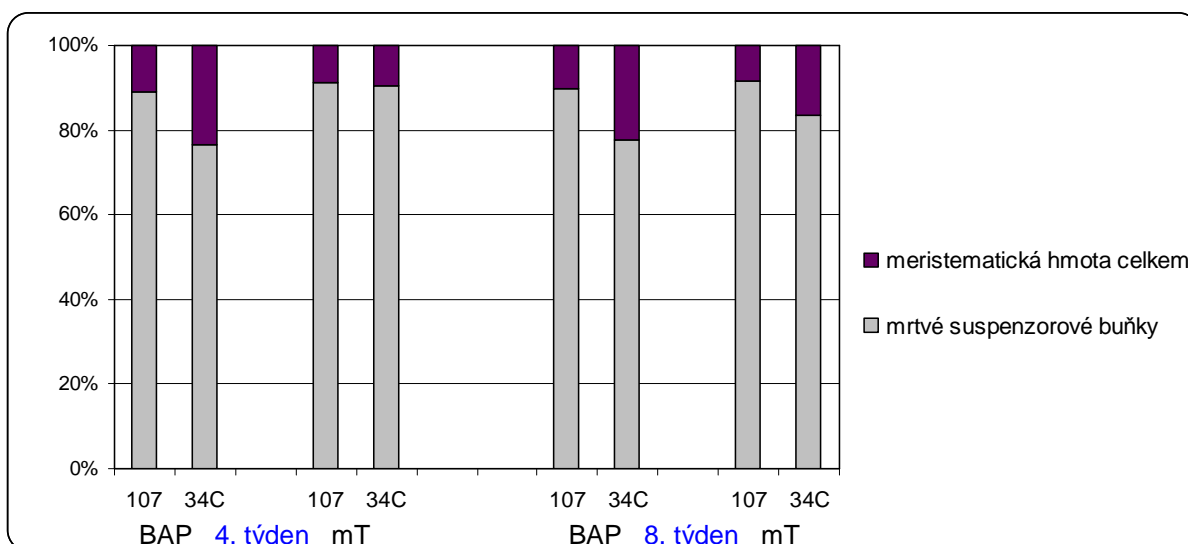
Tab. 8.3.3.2: Statistické vyhodnocení dvouvýběrové ANOVA ukazující rozdíly v poměrném zastoupení jednotlivých stanovených kategorií v závislosti na zvolené kultuře a zvoleném hormonu. Jedná se o druhé odběry sledovaných kultur 107 a 34C, což odpovídalo 8. týdnu kultivace na proliferačním médiu.

V grafu 8.3.3.1 je ukázáno (stejně tak to dokládají uvedené tabulky), že kategorie bílé místo a rovněž mrtvé suspensorové buňky se liší v závislosti na kultuře tak i na zvoleném hormonu. Nicméně zajímavější kategorie (meristematická hmota celkem) se lišila statisticky významně pouze v druhé odběru a to s ohledem na zvolenou kulturu, lepších výsledků

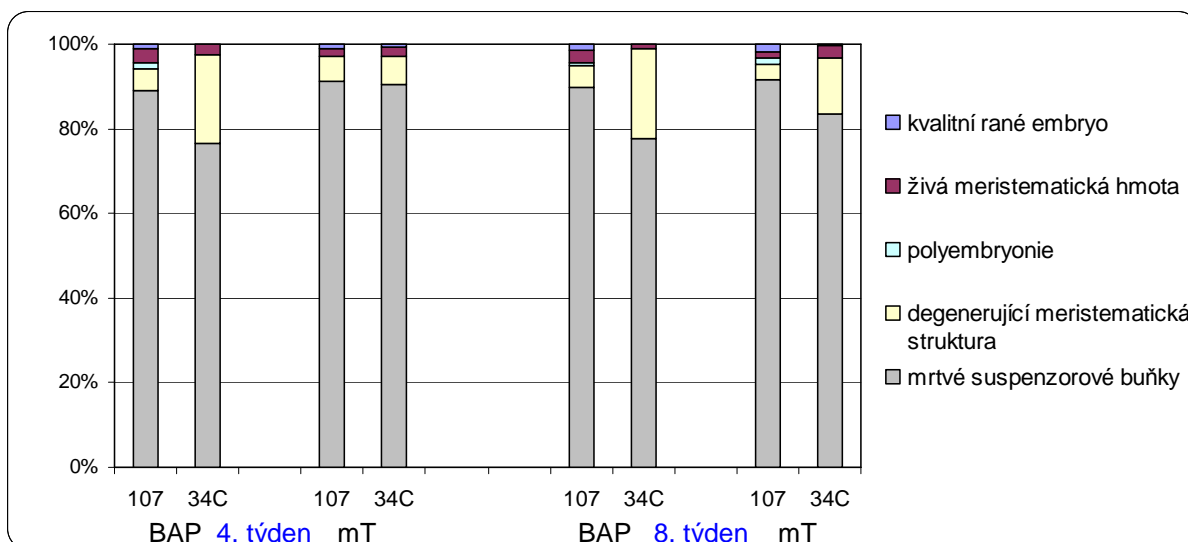
dosáhla kultura 34C. I u prvního odběru v této kategorii graf naznačuje pozitivnější výsledky 34C, nicméně nebyly statisticky průkazné. Následující graf 8.3.3.2 podrobněji ilustruje popsanou skutečnost, je z něj zřetelně patrné, že kultura 34C dosahovala většího procentuálního zastoupení všech meristemických struktur. Graf 8.3.3.3 ukazuje procentuální zastoupení všech jednotlivých nadefinovaných kategorií.



Graf 8.3.3.1: Porovnání poměrného zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií včetně bílého místa. Kategorie živá meristemická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristemická hmota. Srovnání kultur 107 a 34C ve 4. a 8. týdnu kultivace.



Graf 8.3.3.2: Porovnání poměrného zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií včetně bez místa. Kategorie živá meristemická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristemická hmota. Srovnání kultur 107 a 34C ve 4. a 8. týdnu kultivace.



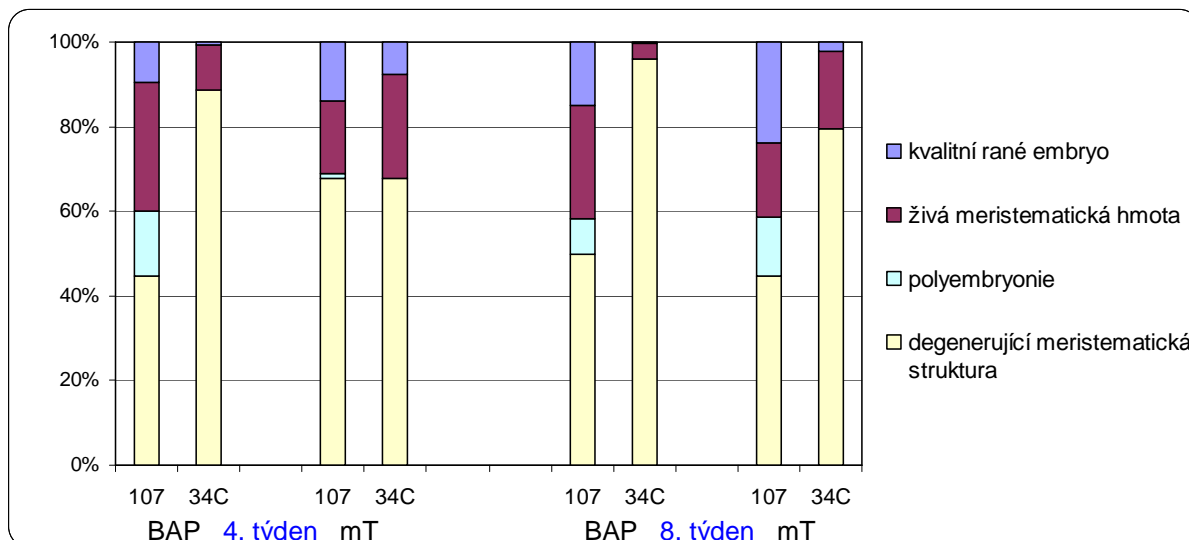
Graf 8.3.3.3: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C. Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa.

Graf 8.3.3.4 vyjadřuje procentuální zastoupení všech meristematických struktur vyskytujících se v kulturách 107 a 34C, 100 % tvoří součet těchto kategorií. Je patrný rozdíl v zastoupení kategorie kvalitní rané embryo mezi posuzovanými kulturami, v prvním odběru je tento rozdíl ještě statisticky nevýznamný, ovšem u druhého odběru je již statisticky průkazné, že u kultury 107 byl podíl kvalitních raných embryí vyšší než u kultury 34C. Rozdíl související s použitím hormonu není statisticky průkazný u této kategorie, i když graf naznačuje, že lépe vycházela varianta s *mT*. Rozdíl ve vyšším podílu živé meristematické hmoty se opět projevil u kultury 107, nicméně statisticky významný byl pouze u prvního odběru. U kategorie polyembryonie je patrný rozdíl jak mezi sledovanými kulturami, tak mezi variantami BAP a *mT*. Nutné podotknout, že u kultury 34C nebyla polyembryonie vůbec pozorována. Byla tedy zastoupená pouze u kultury 107 a to spíše u varianty ošetřené BAP. Jasně prokazatelný výsledek je rozdíl v kategorii degenerující meristematická struktura, tato kategorie byla více zastoupena u kultury 34C, v závislosti na hormonu vyšel v této kategorii lépe BAP, jelikož u této varianty bylo menší procentuální zastoupení. Toto je kategorie, jejíž struktury nejsou pro další vývoj vhodné, proto není její vysoké zastoupení žádoucí.

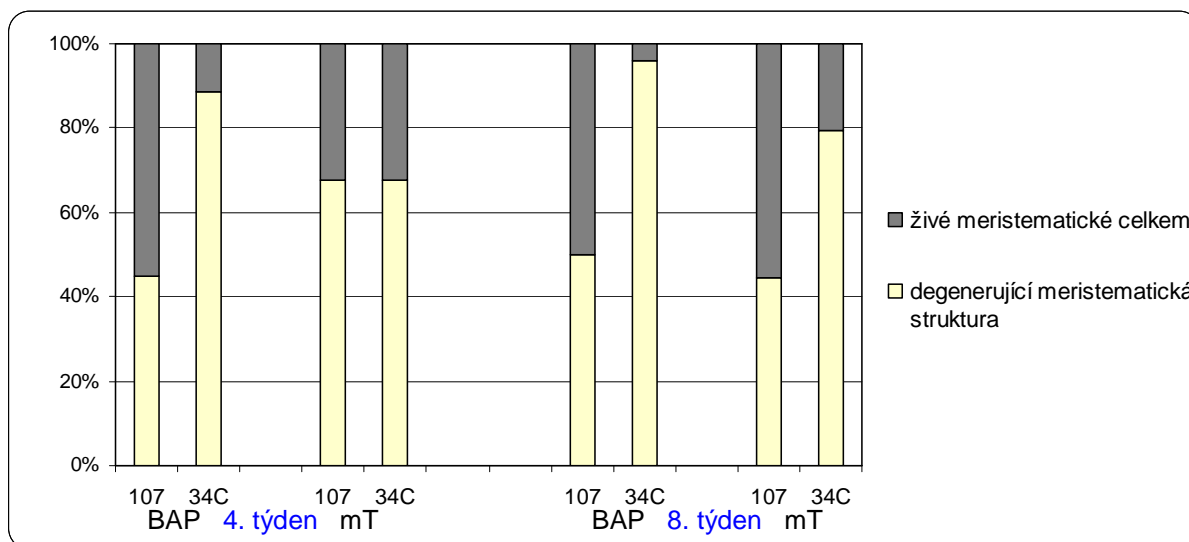
Graf 8.3.3.5 zahrnuje pouze dvě kategorie, všechny živé meristematické hmoty slučuje do jedné skupiny a srovnává jejich podíl z celku s podílem degenerující meristematické hmoty v kulturách. Významný rozdíl v zastoupení degenerujících struktur je patrný mezi jednotlivými kulturami. Kultura 34C má statisticky významnější podíl této hmoty. Pokud tedy v prvním grafu bylo ukázáno, že veškeré meristematické hmoty (tedy včetně degenerujících

struktur) je u kultury 34C více, tak tento graf dokládá, že větší podíl z toho zaujímala právě degenerující hmota, která je však pro další vývoj zcela nevhodná.

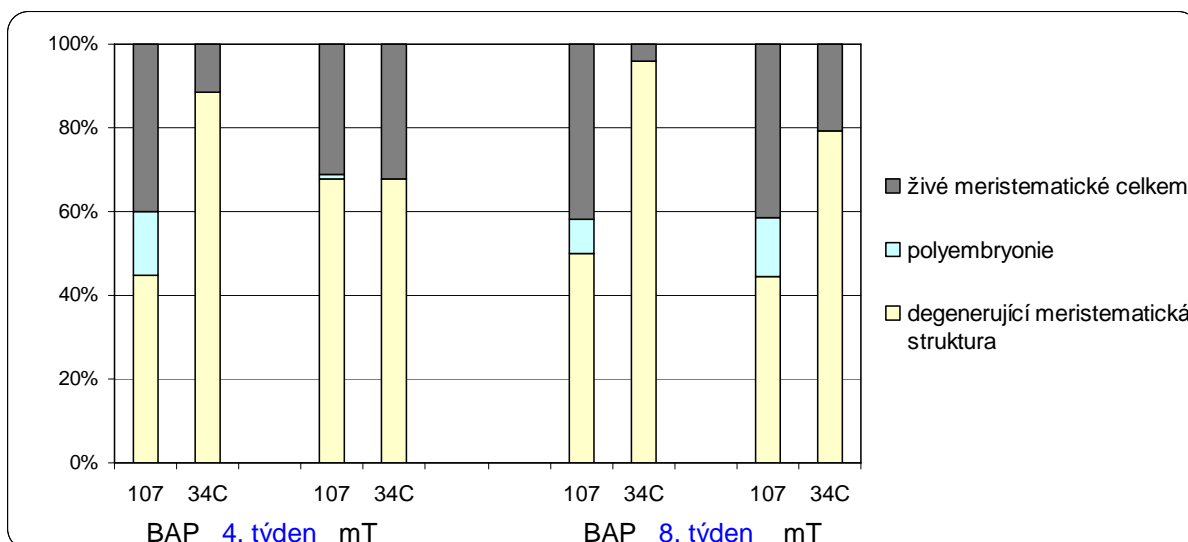
Z grafu 8.3.3.6 je patrné, že polyembryonie se vyskytovala pouze u kultury 107.



Graf 8.3.3.4: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Kategorie živá meristematická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristematická hmota. Srovnání kultur 107 a 34C ve 4. a 8. týdnu kultivace.



Graf 8.3.3.5: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Kategorie živá meristematická celkem: kvalitní raná somatická embrya, polyembryonie a živá meristematická hmota. Srovnání kultur 107 a 34C ve 4. a 8. týdnu kultivace.



Graf 8.3.3.6: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur 107 a 34C: Polyembryonie se vyskytovala pouze u linie 107.

8.3.4. Porovnání kultur 107, 34C a AFO 541 u varianty BAP

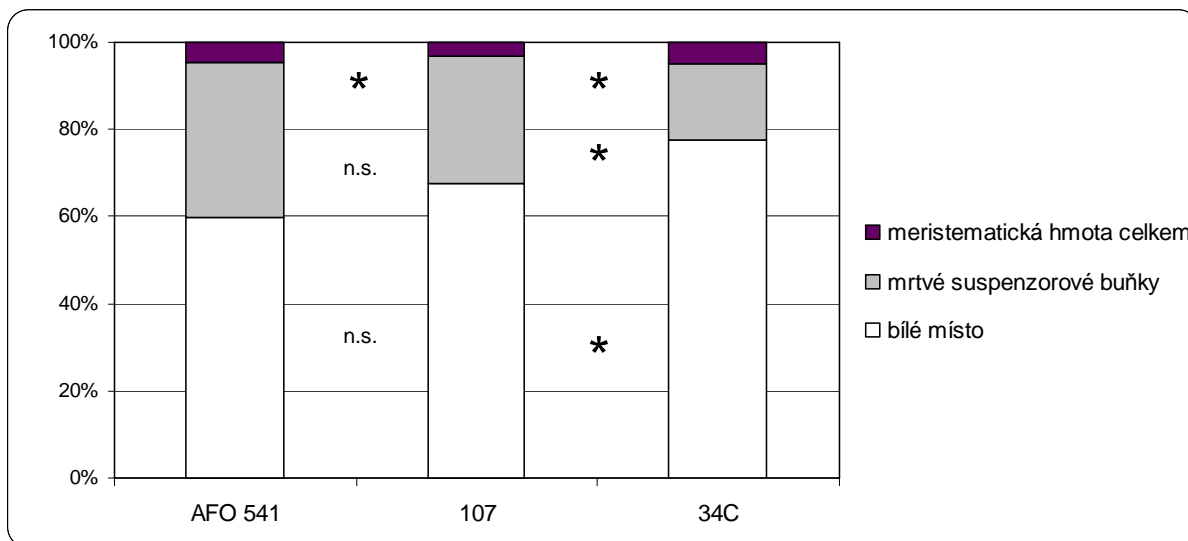
Pro možnost blíže posoudit embryogenní potenciál zkoumaných kultur 107 a 34C, jsem obě kultury navíc porovnávala s velmi dobře a poměrně dlouho známou kulturou AFO 541. Toto porovnání jsem provedla pouze u varianty BAP, protože v době vypracovávání práce jsem neměla k dispozici kulturu AFO 541 pěstovanou na mT.

Statisticky významné rozdíly u všech stanovených kategorií byly mezi kulturou 34C a oběma zbývajících kulturami 107 a AFO 541. Mezi kulturami 107 a AFO 541 bylo pouze málo rozdílů, což dosvědčují následující grafy.

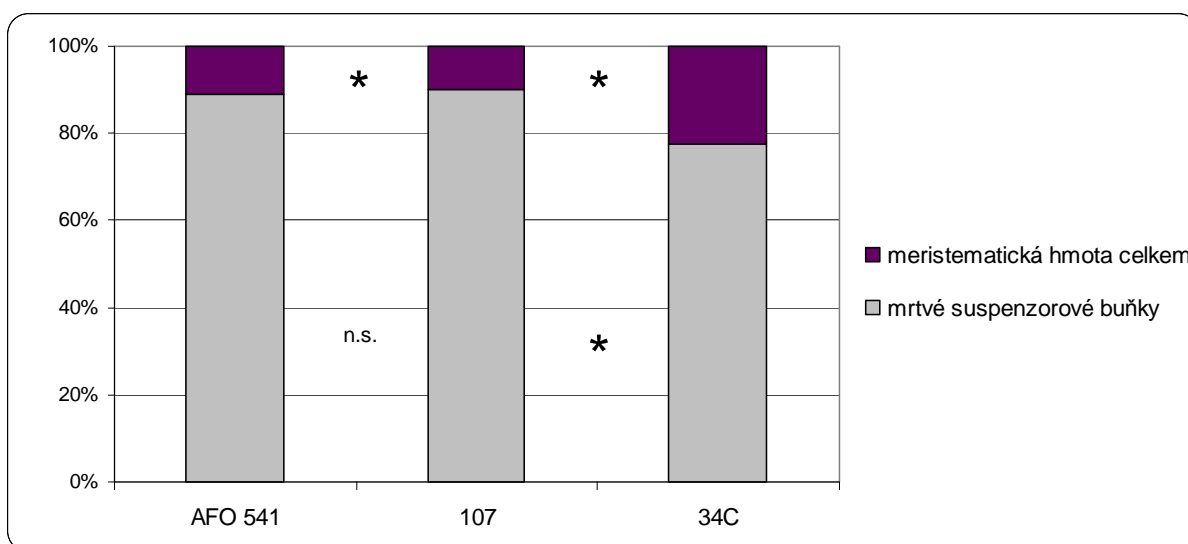
Graf 8.3.4.1 ukazuje rozdíly mezi kulturami, 34C se od obou zbývajících kultur významně liší. Zároveň byl statisticky prokázán i rozdíl mezi kulturami 107 a AFO 541 v zastoupení všech meristematických struktur. Velmi zajímavý je následující graf 8.3.4.2, který dává přehled o tom kolik zaujímal součet meristematických částí z celku oproti mrtvým meristematickým buňkám. Nejvíce pozitivního výsledku dosáhla kultura 34C, která měla v porovnání s oběma zbývajících kulturami dvakrát tolik meristematických struktur. Nicméně jak ukazují zbývající grafy, tak většina této meristematické hmoty spadala do kategorie degenerující meristematická struktura. Graf 8.3.4.3 ukazuje všechny kategorie odděleně.

Graf 8.3.4.4 velmi jasně prokazuje podobnost kultur 107 a AFO 541, kromě kategorie kvalitní rané embryo, ve které si vedla lépe kultura AFO 541, nebyly naměřeny nijak statistické významné rozdíly mezi těmito kulturami. Kultura 34C se opět statisticky velmi odlišovala ve všech kategoriích. Velmi důležité je si také uvědomit, že kategorie

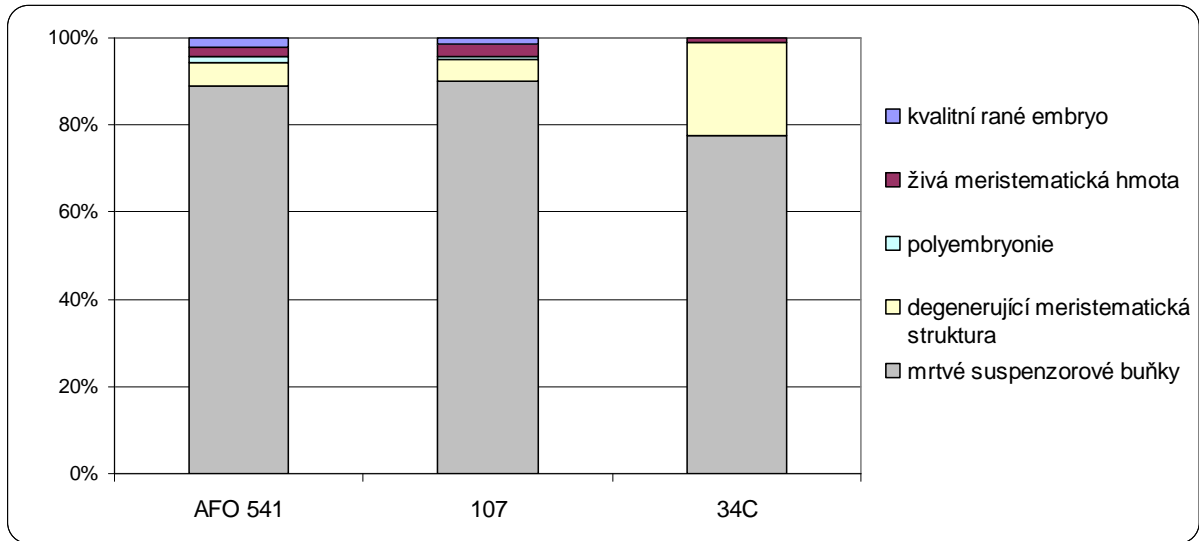
polyembryonie nebyla u kultury 34C vůbec pozorována. Graf 8.3.4.5 pouze dotvází představu o rozdílech kultury 34C od obou zbývajících kultur. Pro lepší přehlednost jsou v tomto grafu sloučeny kategorie kvalitní rané embryo, živá meristemická hmota a polyembryonie, tedy ty kategorie, které představují živou meristemickou hmotu.



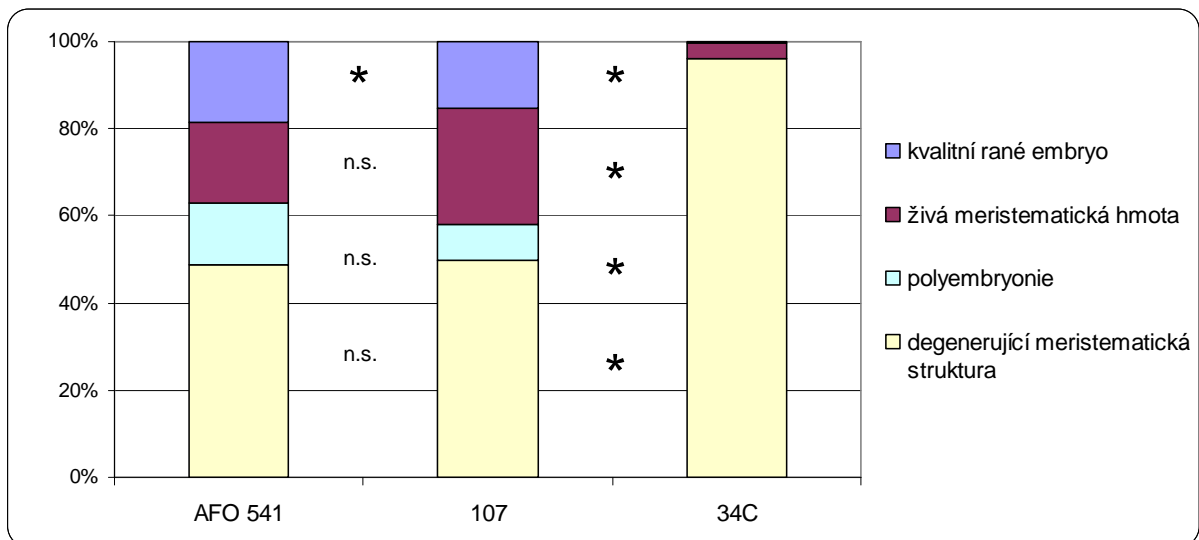
Graf 8.3.4.1: Porovnání poměrného zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií včetně bílého místa. Meristemická hmota celkem zahrnuje: kvalitní raná embryo, živou meristemickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristemickou strukturu. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



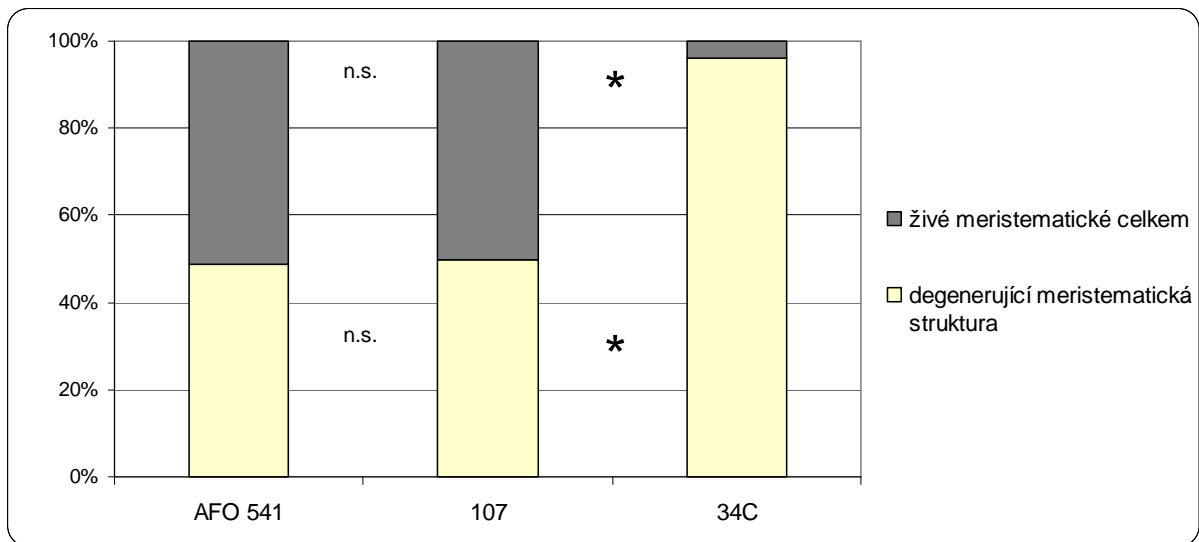
Graf 8.3.4.2: Porovnání poměrného zastoupení meristemické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa. Meristemická hmota celkem zahrnuje: kvalitní raná embryo, živou meristemickou hmotu, polyembryonii a degenerující meristemickou strukturu. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



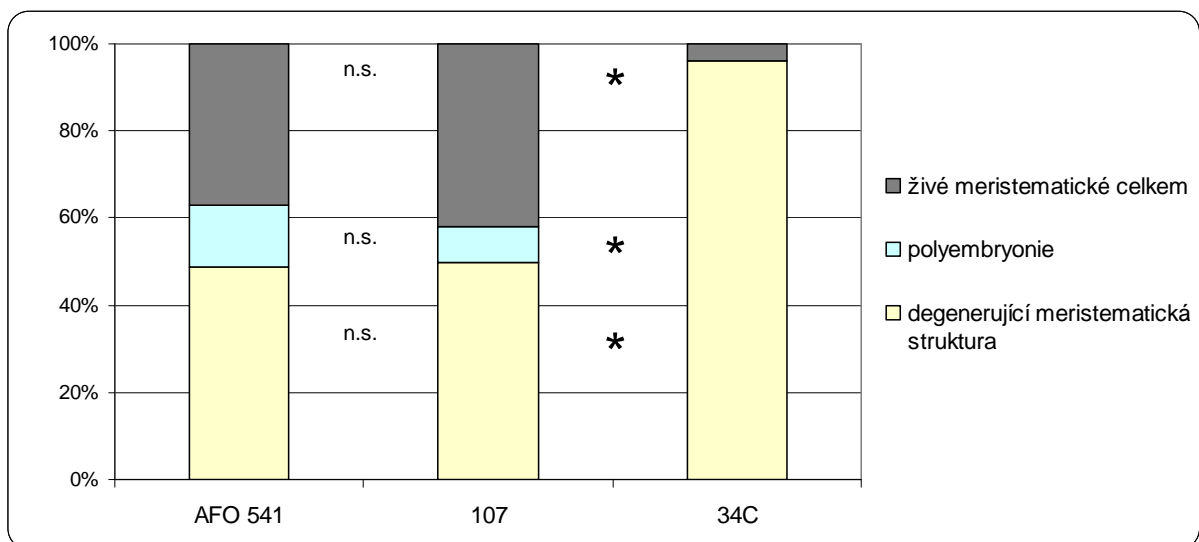
Graf 8.3.4.3: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP. Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech kategorií bez bílého místa.



Graf 8.3.4.4: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.4.5: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.



Graf 8.3.4.6: Porovnání poměrného zastoupení meristematické hmoty na řezech proliferujících kultur AFO 541, 107 a 34C ošetřených na médiu s přidáním BAP: Jako 100 % je v tomto grafu zvolen součet všech meristematických kategorií. Rozdíly mezi variantami byly hodnoceny jednovýběrovým testem ANOVA, hvězdička označuje významný statistický rozdíl.

9. DISKUSE

Volba linií pro experiment

Pro testování vlivu topolinu na strukturální vývoj embryonální suspenzorové hmoty v průběhu proliferační fáze bylo nutné zvolit vhodné kultury. Konkrétními použitými embryogenními kulturami *P. abies* pro tuto práci byly linie 107, 34C a AFO 541. Dvě kultury jsme dostali od Dr. Malé (linie 107 a 34C), v jejímž týmu byly kultury odvozeny a vyhodnoceny jako embryogenní. Tým Dr. Malé ve VÚLHM má letitou praxi ve studiu somatické embryogeneze, pravidelně odvozuje velké množství nových embryogenních kultur. Z důvodu, že dle jejich pozorování dochází po určité době ke ztrátě embryogenního potenciálu linií, v intervalu přibližně dvou let odvozuji embryogenní kultury nové ze somatických embryí ve stádiu maturace. Obě linie 107 a 34C byly považovány za responzivní, s vyšším embryogenním potenciálem a rychlým růstem embryogenní masy v proliferační fázi. Embryogenní linie byly charakterizovány embryogenní kapacitou (potenciálem) vyjádřenou jako počet somatických embryí na gram embryogenní masy, po 5týdenní kultivaci na médiu s ABA. Po roční kultivaci byla embryogenní kapacita u obou kultur vysoká a statisticky mezi nimi nebyl významný rozdíl (134 ± 41 , 142 ± 38), po dvouleté kultivaci se u kultury 34 C výrazně snížil embryogenní potenciál (18 ± 6), zatímco u kultury 107 zůstal relativně vysoký (116 ± 38), Malá a kol. - Výroční zpráva QH82303, 2011. U těchto kultur jsme tedy předpokládali odlišnou reakci na různé cytokininy a případně i zvýšení embryogenního potenciálu.

Abychom mohli proces porovnat s jakýmsi "standardem", tedy zavedenou a dobře prostudovanou embryogenní linií téhož rostlinného druhu, zařadili jsme do studie též kulturu AFO 541. Tato kultura je velice stabilní, dlouhodobě úspěšně používaná, odvozená byla ve Francii počátkem 90. let (Galerie a kol., 1992; Ruaud a kol., 1992). Příklady prací prováděných na kultuře AFO 541 jsou například: Vondráková a kol., 2010, Svobodová a kol., 1999, Schwarzerová a kol., 2010, Lipavská a kol., 2000, Grigová a kol., 2007, Konrádová a kol., 2003.

Diplomová práce zahrnuje výsledky z proliferační fáze SE. Plánem bylo zahrnout do této práce i fázi maturace, bohužel kultury po převedení na maturační médium nejevily uspokojivý vývoj a následně na spolupracujícím pracovišti došlo k mikrobiální degradaci

veškerého materiálu (viz kap. 7. Materiál a metody) a proro se práce musela zúžit pouze na fázi proliferační.

Kvantitativní hodnocení strukturálního vývoje proliferační fáze embryogenní kultury

Dle mně dostupných znalostí, všechny studie v literatuře, které studovaly SE jehličnanů, se při popisu proliferační fáze omezují na kvalitativní popis (např. Hakman a von Arnold, 1988) nebo na semikvantitativní popis zaměřený na výskyt raných somatických embryí (např. Carneros a kol., 2009). Je tedy odůvodnitelný předpoklad, že tato diplomová práce poskytuje zcela originální výsledky kvantitativního hodnocení výskytu různě embryogenních struktur s použitím stereologických metod a systematického rovnoměrně náhodného vzorkování. Tento způsob kvantitativního hodnocení zaručuje nevychýlenost odhadů měřených kvantitativních parametrů.

Pro kvantitativní hodnocení byla vypracována metodika pro stanovování poměrného zastoupení jednotlivých strukturálních kategorií – kvalitní rané somatické embryo, živá meristemická hmota, polyembryonie, degenerující meristemické struktury a mrtvé suspenzorové buňky. Poměrné zastoupení těchto struktur v embryonální suspenzorové hmotě bylo hodnoceno s použitím bodové metody (Weibel, 1979, Albrechtová a Kubínová, 1999). Tyto metody bylo možno použít digitálně prostřednictvím programu Ellipse, modul PG_Multi_FG, který umožňuje zaznamenávat celou řadu nadefinovaných kategorií (částí pozorované struktury) pomocí vícerozměrné mřížky, kdy jednotlivé zásahy do struktur jsou interaktivně označovány různými přiřazenými barvami.

V každém odběru bylo provedeno 36 měření, což zajistilo dostatečnou vypovídající statistickou hodnotu. Přesto při statistickém vyhodnocení jednovýběrové ANOVA, bylo nutné posoudit, zda vyloučit odlehlá pozorování či s nimi také pracovat. Poměrně dost případů bylo v hodnotícím protokolu NCSS, označeno jako nerovnoměrné, nenormální rozdělení, ve kterém se nacházejí odlehlá pozorování. Programem jsem si nechala označit v matici o která konkrétní pozorování jde, vymazala je a spustila program znovu. Výsledek byl ten, že „probability level“ se nikterak nezměnil ve smyslu statistické významnosti. V důsledku toho jsem od vylučování odlehlých hodnot upustila a využívala druhou možnost, kdy program je schopen vyhodnotit i nerovnoměrná měření a ukázat jejich statistické významnosti.

Dalším důvodem proč by nebylo vhodné odlehlá pozorování vylučovat, je to, jakým způsobem se kultura chová. Kultura je velmi heterogenní, na některých mikrofotografiích jsem mohla pozorovat velký počet kvalitní raných embryí a na jiných například nebylo žádné, ale namísto toho se na ní vyskytovaly pouze třeba degenerované struktury, z tohoto důvodu jsem prováděla již zmíněných 36 měření u každé kultury. Je dost pravděpodobné, že oblasti obsahující degenerované meristemické struktury se nacházejí uvnitř embryogenní hmoty a naopak fotografie, které byly naplněné kvalitními meristemickými strukturami se vyskytovaly v přímé blízkosti kultivačního média. Pro tyto domněnky jsem bohužel neprovedla přesnější pozorování. Ve studii provádění na stejném druhu, tedy *P. abies*, bylo pozorováno, že právě embryogenní struktury nalézající se v přímém kontaktu s médiem většinou přežívaly, proliferovaly a následně i vyvíjely, naopak části bez jakéhokoliv kontaktu s kultivačním médiem ve většině případů vyschly a nedosáhly dalšího vývoje (Mo a von Arnold, 1991).

Sledované strukturální útvary proliferační fáze somatické embryogeneze

Celá diplomová práce byla vypracována na embryogenním materiálu smrku ztepilého nacházejícím se v proliferační fázi somatické embryogeneze. Základní charakteristikou proliferující embryogenní kultury *P. abies*, ale i všech jehličnanů obecně, je tvorba kvalitních raných somatických embryí (Hakman a von Arnold, 1988, Svobodová a kol., 1999), které jsou předpokladem pro jejich úspěšný vývoj v dalších návazných fázích SE. Dle mých znalostí dosud neexistuje studie, která by se pokusila detailně, s kvantitativní analýzou, studovat strukturální složení a vývoj kultur v proliferační fázi somatické embryogeneze jehličnanů. Zvolení jednotlivých kategorií nebylo nijak náhodné, vyšlo z bedlivého pozorování námi zvolených embryogenních linií a nejčastěji se vyskytujících buněčných struktur v těchto buněčných kulturách.

První kategorie a zároveň nejvíce sledovaná je kategorie kvalitní rané somatické embryo. Struktura raných somatických embryí byla velmi podrobně popsána v dřívějších studiích, jedná se o bipolární komplex hustě meristemické hmoty na níž navazují podlouhlé vysoce vakuolizované buňky suspenzoru (Hakman a von Arnold, 1988, Svobodová a kol., 1999, Carneros a kol., 2009). Tato kategorie, jak již bylo řečeno, představuje velmi dobrý ukazatel kvality dané kultury, právě tyto struktury raných somatických embryí mají potenciál po přenesení na maturační médium dále se vyvíjet a následně dát vzniku životaschopným rostlinám. Je velmi vhodné připomenout, že raná somatická embrya jsou svojí morfologií

velmi podobná časným stádiím vývoje embryí zygotických (Nagmani a kol., 1995, Svobodová a kol., 1999, von Arnold a kol., 2002).

Další stanovenou kategorií představovaly živé meristemické struktury, které nebylo možné zařadit mezi bipolární kvalitní raná embrya, ale buňky si uchovávaly meristemický charakter: drobné izodiamterické buňky s velkým jádrem a denzní cytoplasmou bez přítomností vakuolárních kompartmentů. Tyto buňky si předpokládaně mohou uchovávat embryogenní potenciál. Jednalo se například o tzv. slunečkové struktury, které byly opět popsány již v dřívějších studiích, představují radiální struktury meristemických oblastí, které jsou obklopeny vysoce vakuolizovanými buňkami (Jalonen a von Arnold, 1991). Častější výskyt konkrétně těchto struktur byl pozorovaný u použité embryogenní kultury 34C, zároveň byly do této kategorie zařazovány i útvary u nichž jsem předpokládala, že se jedná o kvalitní embrya, ale nebyla nafocena v mediální řezové rovině, ani v rovině s ní vodorovnou.

To, jakými různými způsoby je možný vznik raných embryí, vedlo ke stanovení další kategorie, tzv. polembryonie. Štěpná polyembryonie byla opět popsána již před mnoha lety, jedná se o jev, při kterém vzniká více embryí z jediné struktury, která má podobně jako rané somatické embryo bipolární charakter, kdy meristemická část má několik i nepravidelně formovaných meristemických vrcholů a tato meristemická část má následně přilehlý jeden společný suspensor (Hakman a von Arnold, 1988, Jaksik a kol., 1995, Svobodová a kol., 1999). Tento jev bývá pozorován i u zygotické embryogeneze (von Arnold a kol., 2002). Každá buněčná kultura má jiný embryogenní potenciál a často se kultury odlišují i výskytem v četnosti jednotlivých meristemických struktur, což například velmi dobře dokazuje zjištění, že u kultury 34C nebyla vůbec žádná polyembryonie pozorována, nebyl tedy ani pozorován rozdíl v použití hormonu, zřejmě se jedná o charakteristický rys, konkrétně této buněčné embryogenní linie.

Pro velmi vysokou četnost výskytu musela být stanovena další kategorie, kterou jsem v literatuře nenašla definovanou. Její název byl nedefinován jako degenerující meristemické struktury. U těchto struktur byla pozorována výrazná podobnost v jejich organizovanosti jako u embryonálních buněčných struktur obou předchozích kategorií. Degenerace embryonálních struktur se projevovala především v meristemické části v narušení buněčných jader buněk, důkazem byla nedostatečná probarvenost pravou jádrovou červení (podrobněji kap. 8.2.4). O takovýchto útvarech se bohužel dostupná literatura blíže nezmiňuje ani je nijak nepopisuje či nespecifikuje. Lze tedy usuzovat, že se jedná o embryogenní meristemické struktury, u kterých ovšem vždy v době příslušného odběru již započala jejich degenerace tedy jejich embryogenní charakter je silně zpochybněn.

Další neembryogenní strukturou byla kategorie nazvaná suspenzorové buňky (kap. 8.2.5), které byly velmi dobře rozpoznatelné, díky svému podlouhlému tvaru (Hakman a von Arnold, 1988), nicméně se přesto v jejich blízkosti na řezu nenacházela žádná meristemická hlava raného somatického embrya. Samozřejmě je možné, že řez, který je veden kulturou náhodně nemusí procházet mediální rovinou a tedy meristemická hlava mohla být hypoteticky přítomna v jiných, následných řezech odebraným vzorkem. Nicméně tato kategorie byla pozorována pouze u 3. odběru kultury 107 ošetřeného pomocí BAP. Ukázalo se, že to byl ale jediný odběr, u kterého bylo možné tuto kategorii pozorovat, a proto byla tato skupina rozlišených suspenzorových buněk pro svůj nedostatečný výskyt sloučená s poslední kategorií, kterou představují mrtvé suspenzorové buňky.

Poslední neembryogenní strukturou představuje hmota tvořená celulózními buněčnými stěnami mrtvých suspenzorových buněk bez buněčného obsahu, které nejeví žádnou organizovanost. Je to evidentně hmota mrtvá, která postupně během zpracování buněčného materiálu odpadala od embryogenních struktur. Tato strukturální kategorie byla nadefinována, protože tato hmota čítala vysoké procento v poměrném zastoupení. Bylo možné pozorovat rozdíly v četnosti výskytu této hmoty v jednotlivých odběrech. U některých odběrů zaujímala velké procento výskytu, téměř nezbylo žádné bílé pozadí na řezech, naopak u jiných odběrů byla kultura rozvolněnější (graf 8.3.3.1). Nicméně rozvolněnost této hmoty může být i artefaktem, který vznikne až při zpracovávání anatomických řezů.

Srovnání vlivu BAP a *mT* na zvolené embryogenní linie

Cytokininy jsou růstové regulátory, které stimulují buněčné dělení, kontrolují morfogenezi rostlin a mají svou úlohu i v regulaci sekundárního metabolismu rostlin, jsou pro správný vývoj a produkci rostlin *in vitro*, stejně tak i produkci *in vivo* nepostradatelné. Po mnoho let byl isoprenoidní typ cytokininů nejběžněji používaným druhem přidávaným do kultivačních médií, až do okamžiku, kdy byly objeveny aromatické cytokininy (Strnad, 1997). Ty se záhy na to dostaly do popředí zájmů mnoha vědeckých týmů po celém světě s myšlenkou možnosti vhodného zlepšení kultivačního protokolu či možnosti snížení některých abnormalit, které doposud běžně používané cytokininy způsobují (jakými jsou nekróza kořenové čepičky, přehnaná hyperhydratace či předčasná senescence rostlin). Zároveň bylo pozorováno navyšování množství namnožených struktur během kultivace ošetřené *mT* (Malá a kol., 2009, De Diego a kol., 2010).

Do dnešních dní se objevují stále nové studie prováděné na různém rostlinném materiálu, které dokládají pozitivní účinky topolinů. Na základě těchto výsledků dokonce někteří autoři pokládají topoliny na tzv. „všelék“ (Aremu a kol., 2012a).

Oprávněným předpokladem tedy bylo, že i u somatické embryogeneze jehličnanů by mohly topoliny mít pozitivní vlivy na vývoj a četnost kvalitních somatických embryí. Pozitivní vlivy byly pozorovány například u somatické embryogeneze *Leucjum aestivum* na stavbu, kvalitu a i četnost somatických embryí, kde použití *mT* se prokázalo jako nejúspěšnější varianta ošetření. Srovnáváno bylo s varianty BA, Z, K a TDZ. Až 90 % normální embryí bylo pozorováno u ošetření *mT* (Ptak a kol., 2013).

Pro tuto práci byl zvolen konkrétně *mT*, jehož vlivy na kvalitu a zastoupení jednotlivých struktur jsem porovnávala s běžně užívaným BAP. Nejvíce zajímavé kategorie, tedy meristematické struktury, ve všech odběrech zaujímaly velmi nízké procentuální zastoupení z celkové hmoty. U této kategorie byly kultury 107 pozorovány významné statistické rozdíly u variant ošetřených BAP a *mT*. V prvních třech odběrech této kultury (tedy 4., 8. a 12. týden kultivace na proliferačním médiu) si vedla lépe varianta s přidáním BAP. U čtvrtého odběru (16. týden kultivace) nebyly již rozdíly v zastoupení meristematických struktur znatelné (graf 8.3.1.1). Srovnatelné hodnoty ve čtvrtém odběru by mohly naznačovat, že kultura byla příliš dlouho kultivována na proliferačním médiu a následně proto došlo k poklesu ve výskytu meristematických struktur. Lepší výsledky BAP nemusí jasně znamenat, že je tato varianta ošetření kvalitnější. Stejně tak bylo u *S. torminalis* pozorovány v prvních fázích vývoje lepší vlastnosti a vyšší mikropropagaci při ošetření BAP, tento cytokinin prokazoval mnohem vyšší efektivnost během indukce explantátů. Nicméně v pozdějších fázích vývoje se ukázala varianta ošetřená pomocí *mT* jako výhodnější, jelikož rostliny odvozené na BAP nebyly tak dobře schopné zakořenit jako právě varianta s *mT* (Malá a kol., 2009). Zastoupení všech meristematických struktur nám ukazuje jak je daná kultura embryogenní a zvolené ošetření může tento embryogenní potenciál vylepšovat (von Arnold a kol., 2002).

Mnohem důležitější je pozorování týkající se poměrného zastoupení kvalitních raných embryí, živé meristematické hmoty či polyembryonie. Právě tyto kategorie představují výborný ukazatel toho jak je daná kultura, či zvolené ošetření kvalitní (Hakman a von Arnold, 1988, Jalonen and von Arnold, 1991). V tomto případě je tedy možné pouze konstatovat, že si ošetření BAP vedlo v četnosti těchto struktur lépe.

Výrazným trendem v průběhu kultivace bylo, že čím se jednalo o pozdější odběr, tím byla stále více zastoupena kategorie degenerovaných meristematických struktur (graf 8.3.1.4).

Velmi zajímavý je zlom ve třetím odběru (12. týden), kdy varianta na BAP nejeví ještě výrazné navýšení této kategorie, ale varianta ošetřená pomocí *mT* již výrazně navýšila podíl degenerovaných meristemických struktur. Ve čtvrtém odběru se již rozdíl v množství degenerovaných struktur mezi variantami vyrovnaly. Z celého tohoto pozorování lze usuzovat, že embryonálně suspenzorová hmota narůstající na BAP degeneruje později. Zároveň nám toto zjištění může naznačovat jak dlouho lze udržovat a nechávat narůstat embryonálně suspenzorovou hmotu na proliferačním médiu než začne degenerovat. U varianty *mT* by mohlo znamenat zkrácení celkové délky kultivace na proliferačním médiu a dřívější přenesení na maturační médiu dosažení lepších výsledků, což by samozřejmě bylo pro kultivační protokol žádoucí pro potencionální další komerční využití. Nebo pokud by se například snížila délka subkultivačních intervalů, mohla by být varianta s přidáním *mT* lepší než s BAP. Což bylo i prvotním předpokladem. Délka subkultivačního intervalu byla u kultury 107 čtyři týdny, stejnou délka subkultivačního intervalu byla využita i u *P. glauca* (Hakman a von Arnold, 1988). Nicméně pro tyto domněnky nemám žádné vlastní relevantní výsledky.

Pokusím se tedy shrnout pozorované jevy u odběrů provedených na buněčné kultuře 107, které mi připadaly nejzajímavější: ze srovnávaných variant BAP a *mT* si lépe vedla kultura ošetřená na BAP, u které bylo statisticky významně více se vyskytujících kvalitních meristemických struktur, naopak varianta s *mT* obsahovala vysoký podíl degenerovaných struktur. S narůstající dobou kultivace u obou variant ošetření četnost degenerovaných struktur narůstala, konkrétně u BAP pomaleji. Nicméně z literatury jsou známy studie u nichž bylo taktéž předpokladem dosažení lepších výsledků při ošetření některým z topolinů, ale ve výsledcích si překvapivě vedl lépe klasicky používaný cytokinin. Příkladem může být druh *R. hybrida*, který byl ošetřen *MemTR* a BA a mnohem nižší míra produkce rostlin byla pozorována u varianty s *MemTR* (Bogaert a kol., 2006).

U kultury 34C bylo taktéž pozorováno vyšší procento zastoupení meristemických struktur na variantě ošetřené BAP (graf 8.3.2.2). Ovšem velmi zajímavé bylo pozorování, že tato kultura, přestože celkové zastoupení všech meristemických struktur (tedy i včetně degenerovaných meristemických struktur) bylo vyšší u varianty BAP, tak právě ty nejdůležitější živé meristemické struktury byly početnější u varianty ošetřené *mT* (graf 8.3.2.4), tyto výsledky byly statisticky průkazné. Dokonce se v této struktuře u varianty BAP nevyskytovala vůbec kategorie kvalitních raných somatických embryí, což považuji za zvlášť zajímavé a zároveň podivné. Lepších výsledků ve výtěžnosti kvalitních struktur bylo

dosaženo například i u *U. glabra*, kde varianta ošetřená *mT* prokazovala až šestinásobou výtěžnost oproti variantě BA (Malá a kol., 2013).

Embryogenní potenciál jednotlivých kultur

Pro porovnání kultur 107 a 34C jsem využila dvoucestnou ANOVA, pomocí níž jsem vyhodnocovala rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých meristemických struktur a to jednak v závislosti na faktoru kultury, ale také v závislosti na faktoru použitého cytokininu u příslušné kultury a také provázanost těchto dvou zmiňovaných faktorů.

Přestože se předpokládalo, že výsledky budou odvislé především od volby použitého fytohormonu, tak opak byl pravdou, v tomto testu nedosáhly až na výjimky meristemické kategorie statisticky významných rozdílů. Nicméně velmi významné rozdíly byly pozorovány mezi oběma buněčnými liniemi. Embryogenní potenciál kultur se výrazně lišil. Je známo z literatury, že různé odvozené buněčné embryogenní linie vykazují i rozdílný embryogenní potenciál (Egertsdotter a kol., 1993, Egertsdotter a von Arnold, 1993).

I v recentní práci Montalbán a kol. (2013) prováděné na materiálu druhu *P. radiata* byly testovány vlivy cytokininů (BA, *mT* a transzeatin) v koncentracích 25 a 50 μM na různé fáze organogenního procesu, zároveň sledovaly vliv kultivačních podmínek na endogenní hladinu cytokininů a IAA v průběhu organogeneze. Při použití BA či *mT* v indukčním médiu nebylo pozorováno žádné významné zvýšení nebo naopak snížení obsahu endogenních isoprenoidních cytokininů. Zároveň nebyly pozorovány ani rozdíly v kapacitě prodlužujících se výhonů v závislosti na zvoleném cytokininu. V této studii byly pozorovány znatelné rozdíly v kvalitě genotypových buněčných linií, celkem bylo testováno 76 různých genotypů a pouze některé z nich dosahovaly vysokých embryogenních kvalit (Montalbán a kol., 2013).

Embryogenním potenciálem rozumíme tedy to, jaké množství meristemických struktur je daná buněčná kultura schopna vytvářet. Dále se kvalita kultury odvíjí od schopnosti utvářet živé a především kvalitní meristemické struktury. V případě této diplomové práce to jsou tedy kategorie: kvalitní rané somatické embryo, živá meristemická hmota a v neposlední řadě kategorie polyembryonie. Procentuální zastoupení především raných somatických embryí nacházejících se v embryogenní kultuře představuje velmi dobrý ukazatel toho, jaký má daná kultura embryogenní potenciál (Jalonon a von Arnold, 1991).

Nejprve byly srovnávány embryogenní kultury 107 a 34C u dvou odběrů ošetřených na BAP a *mT* (konkrétně se jednalo o odběry provedené ve 4. a 8. týdnu proliferační fáze). Rozdíly byly pozorovány v procentuálním zastoupení jednak kategorie mrtvé stěny, tak i

u kategorií spadající do meristemických struktur. U obou odběrů, a bylo jedno jestli se jednalo o variantu BAP či *mT*, si v četnosti všech meristemických struktur (součet všech meristemických struktur včetně degenerujících meristemických struktur) vedla lépe kultura 34C (graf 8.3.3.2). Záměrně jsem zdůraznila fakt zahrnující i degenerující struktury, protože jak se ukázala během následného vyhodnocení, téměř všechny meristemické struktury u kultury 34C spadaly právě do kategorie degenerované meristemické struktury.

To by mohlo naznačovat buď, že kultura 34C je málo embryogenní a nebo, že délka jejích subkultivačních intervalů či délka kultivace nevyhovovala jejím požadavkům, tedy, že nebyla pro ni příznivá. Faktem ovšem zůstává, jak již bylo zmíněno v předchozím textu, že kultura 34C obsahovala více meristemických struktur vytvářející tzv. slunečkové útvary a polyembryonie u této kultury nebyla vůbec pozorována a zároveň i kvalitních somatických embryí bylo v kultuře pozorováno velmi málo. Jak bylo zmíněné v předchozím textu týkajícího se srovnání variant v ošetření BAP a *mT*, bylo více kvalitních somatických embryí na variantě s přidáním *mT*. Tuto kulturu lze podle mého soudu přesto považovat za embryogenní, jelikož měla potenciál vytvářet embryogenně suspenzorovou hmotu, nicméně většina této hmoty degenerovala, což pro další správný vývoj není nijak žádoucí.

Důkazem pro tyto úvahy byla další série výsledků (kap. 8.3.4), které byly vyhotoveny na odběru provedeném v osmém týdnu kultivace na proliferačním médiu a to u kultur 107, 34C a jako standard vhodný k porovnání byla zvolena dlouhodobě úspěšně používaná kultura AFO 541. Odběr byl u všech kultur na médiu obohaceném o BAP, jelikož je to dlouhá léta běžně používaný fytohormon a je dobře známo, jak se standardní embryogenní kultura AFO 541 za jeho účinků chová nejen v proliferační fázi, ale i v dalších fázích somatické embryogeneze.

Porovnáním těchto tří buněčných linií bylo dosaženo velmi zajímavých výsledků. Ze všech grafů v kapitole 8.3.4 je na první pohled patrné, že kultury 107 a AFO 541 mají naprosto podobné embryogenní vlastnosti, ba dokonce, že i poměrné zastoupení jednotlivých meristemických kategorií je u kultur téměř shodné, mezi těmito dvěma kulturami nebyly až na výjimky pozorovány statisticky významné rozdíly. Naopak buněční linie 34C se od obou diametrálně odlišovala, mezi kulturou 34C a zbylými dvěma kulturami byly prokázány statisticky významné rozdíly ve všech definovaných kategoriích.

Z grafu 8.3.4.5 je naprosto jasně patrné, že procentuální zastoupení živých meristemických struktur u linií 107 i AFO 541 se pohybuje kolem 50 %, ale u kultury 34C dosahuje toto množství sotva 10 %.

Dle klasifikace vytvořené Jalonen and von Arnold (1991), která rozděluje embryogenní buněčné kultury u *P. abies* do tří tříd podle jejich embryogenního potenciálu a vyskytujících se meristemických struktur, námi zvolená embryogenní kultura 107 spadá do třídy A1, kterou autoři považují za schopnou řádné maturace a následně úspěšného vývoje. Taktéž i u kultury AFO 541 je možné tuto třídu přisoudit, takto se o této konkrétní embryogenní linii vyslovili i jiní autoři (Kumstýřová, 1999).

Možnosti využití somatické embryogeneze jehličnanů v praxi

Somatická embryogeneze je u jehličnanů velmi nadějnou metodou pro rychlou reprodukci genotypu. Tuto metodu lze s úspěchem použít pro rychlé namnožení vyšlechtěných genotypů, výsledků genetických manipulací nebo pro reprodukci a zachování cenných a ohrožených populací. Přestože hlavním úkolem současného lesnictví je udržení druhové pestrosti lesních porostů nelze opomenout produkci dřeva jako obnovitelného zdroje energie. Současným trendem, který má zajistit dostatečnou produkci dřevní hmoty, je „klonové lesnictví“, tedy pěstování elitních genotypů namnožených biotechnologickými postupy. Lignikultury, účelové výsadby pouze pro produkci dřeva, s krátkou dobou obměty, založené z několika málo klonů, jsou běžně pěstovány na Novém Zélandu, Austrálii, ve Spojených Státech, Japonsku a v Evropě především ve Francii. U listnatých dřevin se pro efektivní reprodukci s výhodou využívá organogeneze, u jehličnatých dřevin se pro využití k efektivní reprodukci intenzivně studuje právě somatická embryogeneze. V neposlední řadě somatická embryogeneze představuje účinný regenerační systém vhodný pro genetické manipulace a přípravu transgenních linií jehličnatých dřevin, mimo jiné smrku ztepilého (Klimaszewska a kol., 2002, Cyr a Klimaszewska, 2002).

Největší překážkou širšího využití somatické embryogeneze u smrku ztepilého je závislost úspěšné reprodukce na genotypu, tj. responsibilitě jednotlivých buněčných linií a jejich embryogenním potenciálu.

Při reprodukci cenných genotypů touto metodou je totiž třeba dodržovat pravidla jako při jiné vegetativní reprodukci, tj. musí být namnožen dostatečný počet klonů, aby při případné reintrodukcii nedocházelo ke snížení genetické variability populace, což by mohlo mít za následek snížení odolnosti populace vůči nejrůznějším disturbancím, faktorům prostředí či herbivorům. Potřebný počet reprodukováných jedinců závisí na velikosti populace a odhaduje se mezi 30 - 100 genotypy. U dřevin s velkým rozšířením jako je smrk se předpokládá minimálně reprodukce 100 genotypů. Takto vytvořená syntetická populace by

mohla být využita i pro reintrodukci na původní stanoviště (Šindelář 1982, 1989). Naproti tomu u lignikultur výsadeb často na zemědělské půdě, bude možné vysazovat pouze několik nejproduktivnějších genotypů.

Velmi vhodné využití nachází somatická embryogeneze jehličnanů v poskytování genotypů společností zabývajících se pěstování vánočních stromků. Existují společnosti, které se přímo využitím těchto genotypů k produkci vánočních stromků věnují, příkladem může být společnost Weyerhaeuser, která představuje největší společnost věnující se papírenství a výrobě jiných produktů ze dřeva. Jedná se o největšího soukromého vlastníka lesů v USA. Společnost byla založena již roku 1900 Frederickem Weyerhaeuserem a nyní se již po více jak 30 let tato firma zabývá lesnickým výzkumem a experimenty, které mimo jiné zahrnují i genetické zlepšování kvalit vánočních stromků (<http://en.wikipedia.org/wiki/Weyerhaeuser>). Tyto firma též využívá somatické embryogeneze pro přípravu sadebního materiálu, kterým jsou elitní genotypy daného druhu dřeviny (<http://www.weyerhaeuser.com/Businesses/WesternSeedlingSales/ChristmasTreeSeedlings>).

K produkci vánočních stromů dochází po celém světě na farmách (plantážích), které začaly vznikat po roce 1980. Spojené státy, Německo a Kanada, patří mezi přední velmoci v množství vyprodukovaných stromků za rok. Ve Spojených státech se pohybuje roční spotřeba stromků v rozmezí 35 – 40 milionů a v Evropských zemích je to až 50 milionů, to dokazuje, že je to nezanedbatelný průmysl. Například ve Spojených státech je ročně vysazováno 73 milionů nových stromků. Stromky se prodávají po dosažení stáří 6 – 10 let. (http://en.wikipedia.org/wiki/Christmas_tree_production).

Je celá řada druhů vánočních stromků, u kterých je mikroprodukce *in vitro* velmi dobrým příslibem efektivnosti v množení. Například pomocí SE se množí *Abies fraseri* (Pursh) Poir. (Guevin a Kirby, 1997), *Pinus virginiana* NO. a *Pinus strobus* L. (Tang a Newton, 2005), *Pinus eldarica* Medw. (Sen a kol., 1994), velmi dobré mikroprodukce bylo dosaženo také u *Pseudotsuga Menziesii* Mirb. (Traore a kol., 2005) či u *Metrosideros excelsa* (Iapichino a Airò, 2008).

Je tedy zřejmé, že SE je fyziologický proces, který je běžně zařazován do biotechnologických postupů přípravy sadebního materiálu pro komerční pěstování vánočních stromků. Proto se studiu SE a detailním analýzám kultivačního protokolu procesu SE věnuje i nadále značná pozornost.

Velmi často se samotné společnosti pěstující vánoční stromky, zabývají zdokonalováním protokolů. Po dosažení jakéhokoliv zlepšení či objevu si společnosti

nechávací ihned patentovat tyto komerčně využitelné výsledky jejich aplikovaného výzkumu. Do té doby o tom společnosti nepodávají žádné informace vědecké a laické veřejnosti. Důsledkem toho se pak nedostanou tyto objevy obratem ani do vědecké literatury, neboť při publikování práce se tato zjištění stávají veřejnou doménou a jsou tedy volně přístupná komukoli bez poplatku. Zatímco jsou-li komercializovatelné výsledky opatřeny, ať už patentem či jinou formou ochrany duševního vlastnictví, mohou tyto výsledky být použity jiným subjektem pouze za podmínky zpoplatnění vlastníkovu patentu. Výsledky výzkumu firem se dostávají do vědecké literatury proto až po jejich opatřování. Příkladem takových patentů jsou například patenty firmy Wayerhaeuser: u vylepšení ošetření pomocí správné koncentrace ABA v průběhu maturace (Gupta a Pullman, 1991). Dalším je například, že kombinace ABA a aktivního uhlí výrazně zvyšuje počet kvalitních embryí (Pullman a Gupta, 1991) mezi novější patenty patří například patent zlepšující možnost určení zralosti embryí (Carpenter a kol., 2000).

Závěrem bych ráda vyjádřila naději, že moje diplomová práce přispěla určitým dílem ke znalostem, které umožňují zlepšování protokolu pro somatickou embryogenezi smrku ztepilého. Nicméně bude třeba navázat na tuto práci detailním studiem, případně s použitím kvantitativních metod hodnocení anatomických struktur v dalších fázích SE – maturace, germinace a aklimatizování.

10. SHRNU TÍ

Níže uvedené závěry odpovídají výsledkům řešených cílů:

- 1. Vypracovat metodiku pro kvantitativní hodnocení strukturálního vývoje proliferační fáze somatické embryogeneze se podařilo většinou. Byla vypracována metodika hodnocení poměrného zastoupení embryogenních struktur s použitím bodové metody a systematicky rovnoměrné náhodné vzorkování. Pouze se nepodařilo dořešit problém segmentace jader meristemických oblastí pro analýzu obrazu, nicméně z časových důvodů tato metoda nebyla aplikována
- 2. V práci byly nadefinovány kategorie zastupující jednotlivé embryogenní struktury, které se vyskytovaly v embryogenních kulturách. Na základě toho bylo následně měřeno procentuální zastoupení jednotlivých embryogenních struktur. Vedle kategorií zahrnující běžně se vyskytující struktury, jakými jsou kvalitní rané somatické embryo, živá meristemická hmota či polyembryonie, se v této studii definovala i kategorie degenerující meristemické struktury, o kterých se dle mých znalostí v literatuře nepíše.
- 3. Předpokládaná rozdílnost ve variantách ošetřených BAP a *mT*, kdy bylo předpokladem, že varianta *mT* bude prospívat mnohem lépe než varianta ošetřená pomocí BAP, se nepotvrdila u všech kultur. U kultury 34C se při ošetření *mT* vyskytovalo více živých meristemických struktur, než u varianty BAP. U kultury 107 ve všech odběrech prospívala varianta ošetřená BAP lépe, obsahovala vyšší procentuální zastoupení živých meristemických struktur narozdíl od ní varianta ošetřena *mT* měla vyšší podíl degenerovaných meristemických struktur.
- 4. Použitými embryogenními kulturami byly linie: 107, 34C a AFO 541. Porovnáním bylo zjištěno, že kultura 107 a AFO 541 se chovají velmi podobně. Toto zjištění bylo stanoveno na základě procentuálního zastoupení jednotlivých embryogenních kategorií. Kultura 34C se od obou zbývajících kultur výrazně lišila ve své embryogenním potenciálu a kvality vyskytujících se meristemických struktur. U této kultury se vůbec nevyskytovala kategorie polyembryonie. Nejvyššího procentuálního zastoupení dosahovala u této linie kategorie degenerující meristemické struktury.

Z hlediska testovaných hypotéz je tedy možno uzavřít, že:

- 1) H1: Kultury rostoucí na médiu s přídavkem *mT* budou prospívat mnohem lépe než varianta ošetřená pomocí BAP.

Hypotéza H1 se nepotvrdila pro všechny linie.

- 2) H2: Kultury rostoucí na médiu s přídavkem *mT* budou mít větší poměrné zastoupení meristemických struktur, především raných somatických embryí, případně polyembryonie než varianta ošetřená pomocí BAP.

Hypotéza H2 se nepotvrdila pro všechny linie.

- 3) H3: Studované kultury 107, 34C a AFO 541 budou vykazovat obdobný strukturální vývoj odpovídající vysoce embryogenním liniím.

Hypotéza H3 se potvrdila pro linie 107 a AFO 541.

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Albrechtová J, Kubínová Z, Soukup A & Janáček (2013). Chapter 5. Image Analysis: Basic Procedures for Description of Plant Structures on Anatomical Sections. In *Plant Cell Morphogenesis, Methods and Protocols* (Eds: Viktor Žárský, Fatima Cvrčková), HumanaPress, in press
2. Albrechtová J & Kubínová Z (1999). Učebnice kurzu ke konferenci S4G.
3. Amoo S, Finnie JF & Van Staden J (2011). The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul*, 63: 197–206
4. Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF & Staden JV (2012a). Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108: 1-16
5. Aremu AO, Bairu MW, Szučová L, Doležal K, Finnie JF & Staden JV (2012b). Shoot a root proliferation in Williams banana: are the topolins Berger cytokinins? *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 111: 209-218
6. Bairu MW, Stirk WA, Doležal K & Van Staden J (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 90: 15–23
7. Bairu MW, Jain N, Stirk WA, Doležal K & Van Staden J (2009a). Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *S Afr J Bot*, 75: 122–127
8. Bairu MW, Stirk WA & Van Staden J (2009b). Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 98: 239–248
9. Bairu MW, Aremu AO & Van Staden J (2011a). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul*, 63: 147–173
10. Bairu MW, Novák O, Doležal K & Van Staden J (2011b). Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regul*, 63: 105–114
11. Becwar MR, Nagmani R & Wann SR (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.*, 20: 810-817
12. Bogaert I, Van Cauter S, Werbrouck SPO & Doležal K (2006). New aromatic cytokinins can make the difference. *Acta Hortic*, 725: 265–270
13. Bozhkov PV, Filonova LH von Arnold S (2002). A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by a withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotech. Bioeng.*, 77: 658-667
14. Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L & Schmölling T (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*, 44: 314-333
15. Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Park YS, Toribion M & Bonga JM (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 98: 165-178.
16. Cortizo, M, Diego, DE, Moncaleán, P & Ordas, RJ (2009). Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.). *Trees-structure and function*, 23: 835-842.
17. Cuesta C, Novak O, Ordas RJ, Fernandez B, Strnad M, Dolezal K & Rodriguez A (2012). Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between-family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. *J. of plant physiology*, 169: 1830-1837
18. Cyr DR & Klimaszewska K (2002). Conifer somatic embryogenesis: II. *Applications. Dendrobiology*, 48: 41–49
19. De Diego, N (2011). Improved micropropagation protocol for maritime pine using zygotic embryos. *Scandinavian Journal of Forrest Research*, 26: 202-211
20. Diego, DE, Montalbána, IN DE & Moncaleán, P (2010a). In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. *Trees. South African Journal of Botany*, 78: 158-162

21. Diego, DE, Montalbána, IN DE & Moncaleán, P (2010b). In Vitro Regeneration of *Pinus spp.* Adult Trees: New Method for Obtaining Clonal Plants. *IV international symposium on acclimatization and establishment of micropropagated plants*, 865: 361-365.
22. Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Arnold S, Zimmerman R & Ziv M (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 30: 135–140
23. Doležal K, Popa I, Hauserová E, Spíchal L, Chakrabarty K, Novák O, Kryštof V, Voller J, Holub J & Strnad M (2007). Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorg Med Chem*, 15: 3737–3747
24. Dunstan DI, Bethune TD & Bock CA (1993). Somatic embryo maturation from long-term suspension cultures of white spruce (*P. glauca*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 29: 109-112
25. Durzan DJ & Chalupa V (1976). Growth and metabolism of cells and tissue of jack pine (*Pinus banksiana*). III. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Can. J. Bot.*, 54: 456-467
26. Durzan DJ (1980). Progress and promise in forest genetics. In Proceedings of the 50th Anniversary Conference, Paper Science and Technology, The Cutting Edge, My 8-10. 1979. *The Institute of Paper Chemistry*, Appleton, WI, 31-60
27. Egertsdotter U, Mo LH & von Arnold S (1993). Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum*, 88: 315-321.
28. Egertsdotter U & von Arnold S (1993). Classification of Embryogenic Cell-lines of *Picea abies* as Regards Protoplast Isolation and Culture. *Journal of Plant physiology*, 141: 222-229.
29. Escalona M, Cejas I, González-Olmedo J, Capote I, Roels S, Canal MJ, Rodríguez R, Sandoval J & Debergh P (2003). The effect of meta-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. *Intimusa*, 12: 28–30
30. Filonova LH, Bozhkov PV & von Arnold S (2000a). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Botany*, 51: 249-264.
31. Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B & von Arnold S (2000b). Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryo in gymnosperm, Norway spruce. *Journal Cell Science*, 113: 4399-4411.
32. Find JI (1997). 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 Sci.*, 128: 75-83
33. Finer JJ, Kriebel HB & Becwar MR (1989). Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Plant Cell Reports*, 8: 203-206
34. Galerne M, Bercetche J & Dereuddre J (1992). Cryoconservation of embryogenic callus of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) – Influence of different factors on callus recovery and on embryo and plant production. *Bulletin de la société botanique de France-letter botaniques*, 139: 331-344
35. Gösslová M (2000). Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) Karst.): somatická embryogeneze probíhající v tekutých médiích a zygotická embryogeneze, Karlova Univerzita v Praze, deponováno v knihovně PřF UK.
36. Grigová M, Kubes M, Drázná N, Rezanka T & Lipavská H (2007). Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiol*, 27: 1533-40
37. Guevin TG & Kirby EG (1997). Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 219–222
38. Gupta PK & Durzan DJ (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology*, 5: 147-151
39. Gupta PK & Pullman GS (1991). Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. US Patent 5,036,007, Google Patents
40. Gutmann M, von Aderkas P, Label P & Lelu M (1996). Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.*, 47: 1905-1917

41. Hakman I, Fowke LC, von Arnold S & Eriksson T (1985). The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci.*, 38: 53-59
42. Hakman I & von Arnold S (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). *Physiol. Plant.*, 72: 579-587
43. Hartig K & Beck E (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, 8: 1-8
44. Havelková L (2010). Úloha cytoskeletu v morfogenezi rostlinných buněk. Karlova Univerzita v Praze, deponováno v PřF UK
45. Hazubska-Przybyl T & Bojarczuk K (2008). Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* 'glauca' and *P. breweriana*). *Acta societatis botanicorum polonia.*, 77: 189-199
46. Holub J, Hanuš J, Hanke DE & Strnad M (1998). Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regul.*, 26: 109-115
47. Chalupa V (1985). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryo of *Picea abies* (L.) Karst. *Communicationes Instituti Forestalis Čechosloveniae*, 14: 57-63
48. Chalupa V, Malá J & Dujíčková M (1990). Somatic embryogenesis and regeneration of spruce (*Picea abies* /L./Karst.) and oak (*Quercus robur* L.). In: „Manipulation in vitro in higher plants“, *Proc. Conf. Inst. Exp. Botany*, Prague, CSAS, Olomouc, CR : 98
49. Iapichino G & Airò M (2008). Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44: 330-337
50. Jalonen P & von Arnold S (1991). Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Reports*, 10: 384-387.
51. Jasik J, Salajova T & Salaj J (1995). Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryo in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Protoplasma*, 185: 205-211
52. Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu M-A & Séguin A (2001). Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryonic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37: 748-755
53. Kotyk A, Kamínek M, Pulkrábek J & Zahradníček J (1996). Effect of in vivo and in vitro application of the cytokinin N6-(m-hydroxybenzyl) adenosine on respiration and membrane transport processes in sugar beet. *Biol Plantarum*, 38: 363-368
54. Kubaláková M & Strnad M (1992). The effects of aromatic cytokinins (populins) on micropropagation and regeneration of sugar beet in vitro. *Biol Plantarum*, 34: 578-579
55. Kumštýřová L (1999). Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) probíhající na pevných médiích. Karlova Univerzita v Praze, deponováno v PřF UK.
56. Lelu MA & Label P (1994). Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiologia Plantarum*, 92: 53-60.
57. Letham DS (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci*, 2: 569-573
58. Li CHH, Liu BG, Kim TD, Moon HK & Choi YK (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite genotypes of *Picea koraiensis*. *Plant Biotechnik Rep*, 2: 259-265.
59. Lipavská H & Konrádová H (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40: 23-30
60. Lipavská H, Svobodová H, Albrechtová J, Kumštýřová L, Vágner M & Vondráková Z (2000). Somatic embryogenesis in Norway spruce: carbohydrate status during embryo maturation and the effect of polyethylene glycol treatment. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36: 260-267.
61. Macháčková I., v knize: Fyziologie rostlin (Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., ed.), kap.8. *Academia*, Praha 1998.
62. Malá J. (1991). Organogenesis and somatic embryogenesis in Norway spruce. *Comm. Inst. For. Čechoslov.*, 17: 59-72, 1991.
63. Malá J, Máchová P, Cvrčková H, Karady M, Novák O, Mikulík J, Hauserová E, Greplová J, Strnad M & Doležal K (2009). Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* [L.]

- Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis. *J. Plant Growth Regul.*, 28: 341-348
64. Malá J, Cvikrová M, Máchová P, Cvrčková H, Martincová O & Vondráková Z (2012). Výroční zpráva QH82303, 2011, Výzkumný ústav Lesního hospodářství a myslivosti, Strnady
 65. Malá J, Máchová P, Cvrčková H, Karady M, Novák O, Mikulík J, Dostál J, Strnad M & Doležal K (2013). The role of cytokinins dutiny mikropropagation of wych elm. *Biologia Plantarum*, 57(1): 174-178
 66. Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH & Strong FM (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc*, 77: 1392–1393
 67. Mo LH & von Arnold S (1991). Origin and Development of Embryogenic Cultures from Seedlings od Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Plant Physiology*, 138: 223-230
 68. Montalbána IN, Diego DE & Moncaleán P (2011). Testing novel cytokinins for improved in vitro adventitious shoots formation and subsequent ex vitro performance in *Pinus radiata*. *FORESTRY*, 84: 363-373
 69. Montalban IA, Novak O, Rolcik J & Strnad M (2013). Endogenous cytokinin and auxin profiles during in vitro organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physologia Plantarum*, 148: 214-231
 70. Nagmani R, Diner AM, Garton S & Zipf AE (1995). Anatomical Comparison of Somatic and Zygotic Embryogeny in Conifers. In: Somatic Embryogenesi in Woody plants Vol. 1, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 23-48
 71. Niedz RP & Ebene TJ (2011). The effects of bentlyadenine and meta-topolin on in vitro shoot regeneration of sweet orange. *ARNP J. of Agricultural and Biological Science*, Vol. 6, No. 3
 72. Pospíšilová J, Synková H, Haisel D & Semerádová S (2007). Acclimation of plantlets to ex vitro conditions: effects of air humidity, irradiance, CO2 concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horti*, 748: 29–38
 73. Ptak A, Simlat M, Kwiecien M & Laurain-Mattar D (2013). *Leucojum aestivum* plants propagated in in vitro bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Engeneering in life science*, 13: 261-270
 74. Pullman GS & Gupta PK (1991). Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using adsorbent materials in the development stage media. US Patent 5,034,326, Google Patents
 75. Radchuk R, Emery RJN, Weier D, Vigeolas H, Geigenberger P, Lunn JE, Feil R, Weschke W & Weber H (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J.*, 61: 324-338
 76. Ruaud JN, Bercetche J & Paques M (1992). 1st evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Reports*, 11: 563-566
 77. Salajova T, Salaj J, Jasik J & Kormuntak A (1995). Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. In: Somatic embryogenesi in in Woody Plants Vol. 3, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 207-220.
 78. Salajova T, Jasik J, Kormutak A, Salaj J & Hakman I (1996). Embryogenetic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica*, and *Abies numidica*). *Plant Cell Reports*, 12: 199-202
 79. Sen S, Magallanescedeno ME, Kamps RH, McKinley CR & Newton RJ (1994). In vitro mikropropagation of Afgan pine. *Canadian Journal of Frorest Researcg – Revue Canadienne de Recherche Forestiere*, 24: 1248-1252
 80. Schwarzerová K, Vondráková Z, Fischer L, Bořková P, Bellinvia E, Eliášová K, Havelková L, Fišerová J, Vágner M & Opatrný Z (2010). The role of acetin isoforms in somatic embryogenesis in Noeway spruce. *BMC Plant Biology*, 10: 89
 81. Svobodová H (2001). Maturation of Norway spruce somatic embryo: Selected structural and biochemical aspects. Karlova Univerzita v Praze, deponováno v PřF UK.
 82. Svobodová H, Albrechtová J, Kumštýřová L, Lipavská H, Vágner M & Vondráková Z (1999). Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiol. Biochem.*, 37 :209-221

83. Stasolla C, Kong L, Yeung EC & Thorpe TA (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38: 93-105
84. Stastolla C & Yeung EC (2003). Recent advances in conifers embryogenesis: improving somatic duality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 15-35.
85. Strnad M (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101: 674-688
86. Šindelář J (1982). Koncepce programů vegetativního množení lesních dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 27/4: 1-4
87. Šindelář J (2002). K problematice autovegetativního množení lesních dřevin z hlediska genetiky a šlechtění – náměty pro lesnickou praxi. *Zprávy lesnického výzkumu*, 47/2: 73-76
88. Strnad M, Hanuš J, Vaněk T, Kamínek M, Ballantine JA, Fussell B & Hanke DE (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus 9 canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry*, 45: 213-218
89. Tang W & Newton RJ (2005). Micropropagation through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures derived from mature embryos of Christmas tree species. *Propagation of ornamental plants*, 5: 59-66
90. Taore A, Xing ZZ, Bonser A & Carlson J (2005). Optimizing a protocol for sterilization and in vitro establishment of vegetative buds from mature fir trees. *Hortscience*, 40: 1464-1468
91. Tarjowski P, Doležal K & Strnad M (2004). Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy*, 98: 834-841.
92. Tarkovská D, Doležal K, Tarkowski P, Astot C, Holub J, Fuksová K, Schmulling T, Sandberg G & Strnad M (2003). Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus 9 canadensis* leaves by LC-(?)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plantarum*, 117: 579-590
93. Tautorus TE, Fowke LC & Dusitan DI (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69: 1873-1899
94. Vágner M, Fischerová L, Špačková J & Vondráková Z (2005). Somatic embryogenesis in Norway spruce. In: Jain SM & Gupta PK (eds) *Protokol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, The Netherlands, 141-155.
95. Van Staden J, Cook EL & Noodén LD (1988). Cytokinins and senescence. In: Noodén LD, Leopold AC (eds) *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA, pp 281-328
96. von Arnold S, Egertdotter U, Ekberg I, Gusta P, Mo H & Nrgaard J (1995). Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). In: *Somatic Embryogenesis in Woody plants Vol.3*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 17-36
97. von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J & Filonova L (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
98. von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Filonova L, Ho KA, Ingouff M & Wiweger M (2005). Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 323-329
99. Vondráková Z, Eliášová K, Fischerová L & Vágner M (2011). The role of auxin in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6(4): 584-596.
100. Webster FB, Roberts DR, McInnis & Sutton CS (1990). Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Canadian Journal of Forest Research*, 20: 1759-1765
101. Weibel ER (1979). Stereological methods. Vol. 1. Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press
102. Weibel ER (1979). Stereological methods. Vol. 1. Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press.
103. Werbrouck S, Van der Jeugt B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen H & Debergh P (1995). The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* 'Schott Petite' in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Rep*, 14: 662-665
104. Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA & Debergh PC (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol. Plant.*, 98: 291-298
105. Wojtania A (2010). Effect of meta-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium 9 hortorum* and *Pelargonium 9 hederifolium* cultivars. *Acta Soc Bot Pol*, 79: 101-106