

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyziologie rostlin**

Somatická embryogeneze jehličnanů: vliv sacharidů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Ondřej Skala

Školitel: RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Praha 2006

Obsah

1.	Úvod	5
2.	Nutriční role sacharidů během somatické embryogeneze jehličnanů	6
2.1	Metabolismus sacharosy.....	6
2.1.1.	<i>Klíčové enzymy sacharosového metabolismu</i>	6
2.1.2.	<i>Dynamika endogenních rozpustných sacharidů a aktivit klíčových enzymů sacharosového metabolismu</i>	7
2.2.	Metabolismus ostatních sacharidů somatickými embryi jehličnanů.....	10
2.3.	Vliv sacharidů aplikovaných do média na tvorbu a ukládání zásobních látek u somatických embryí jehličnanů.....	11
3.	Signální úloha sacharidů	12
3.1.	Cukerná signalizace u rostlin.....	13
3.2.	Interakce cukerné signalizace s rostlinnými hormony.....	17
3.3.	Signální úloha sacharidů v průběhu somatické embryogeneze jehličnanů.....	17
4.	Sacharidy a jejich osmotická úloha v somatické embryogenezi jehličnanů	19
5.	Ochranná funkce sacharidů	20
6.	Seznam použité literatury	24

Abstrakt

Somatická embryogeneze představuje velmi účinnou metodu vegetativního rozmnožování jehličnanů a zároveň vhodný model pro teoretické studium vývojových procesů spojených s embryogenezí těchto rostlin (Hakman, 1993). Existuje mnoho vnějších faktorů, které somatickou embryogenezi jehličnanů navozují a dále ovlivňují. Mezi nejdůležitější z těchto faktorů patří růstové regulátory (viz. souhrnný článek Stasolla et al., 2002) a sacharidy aplikované do media (Jain et al., 1995). Jejich působení se může nejen druhově, ale také genotypově odlišovat. Sacharidy zastávají u rostlin, a tudíž i u embryí jehličnanů, čtyři základní funkce. V první řadě slouží somatickým embryím jako zdroj energie a uhlíkových skeletů. Také představují signální molekuly, které jsou schopné aktivovat složitou signální transdukční síť, která ovlivňuje expresi genů v embryích, a tím usměrňuje průběh somatické embryogeneze. Sacharidy mají funkci osmotika a jsou jednou z ochranných složek při protekci buněčných struktur embryí v průběhu desikace a jiných situacích, kdy dochází k poklesu obsahu vody v pletivech. Právě tato multifunkčnost sacharidů v průběhu somatické embryogeneze jehličnanů přináší řadu problémů při interpretaci získaných dat.

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
PEG	polyetylen glykol
RFO	oligosacharidy rafinosové řady
SE	somatická embrya
SPS	sacharosa fosfát syntasa
SuSy	sacharosa syntasa
ZE	zygotická embrya

1. ÚVOD

První práce zabývající se somatickou embryogenezí jehličnanů byly představeny již v roce 1985 (*Picea abies* - Chalupa, 1985; Hakman a von Arnold, 1985; Hakman et al., 1985). V uplynulých jednatřiceti letech se podařilo tento proces navodit a dovést do různých vývojových stádií u zástupců mnoha rodů jehličnanů (viz. seznamy Gupta a Grob, 1995; Stasolla et al., 2002). Praktická využití této metody jsou velmi významná, a proto zvláště v posledních letech přibývá mnoho nových kultivačních protokolů pro somatickou embryogenezi různých druhů jehličnanů.

Von Arnold a Hakman (1988) rozdělily somatickou embryogenezi jehličnanů do čtyř základních kroků. Dnes je tento proces rozfázován často do pěti a více kroků – 1) indukce tvorby embryonálně-suspenzorové hmoty (ESM), která již obsahuje zformovaná proembrya jehličnanů, 2) udržovací fáze (v této fázi je ESM množena), 3) někdy je řazena tzv. prematurační fáze (např. Taber et al., 1998; Schuller et al., 2000) 4) zrání (maturace), 5) desikace, 6) regenerace v rostliny schopné růst v podmínkách *ex vitro* (von Arnold et al., 2002). Tyto kroky probíhají za působení různých kultivačních podmínek a jejich konkrétní počet závisí na zvoleném druhu jehličnanu. Optimální průběh kroku předchozího se odráží v krocích následných a projevuje se na kvalitě i kvantitě výsledné produkce somatických embryí (SE) (Stasolla et al., 2002). Pro jednotlivé kroky somatické embryogeneze konkrétního druhu jehličnanu mohou být optimální různé druhy sacharidů v různých koncentracích (např. Schuller et al., 2000). Koncentrace aplikovaných sacharidů do media, například sacharosy, se pohybují nejčastěji v rozmezí od 1 % do 6 % (Lipavská a Konrádová, 2004).

Sacharosa je při somatické embryogenezi jehličnanů nejčastěji používaným exogenně aplikovaným sacharidem do média (Attree a Fowke, 1993). To platí zejména pro dlouhodobě zkoumaný rod *Picea*. Ale i v rámci tohoto rodu existují určité výjimky. Například *Picea rubens* preferuje cellobiosu a o něco méně maltosu nad sacharosou (Tremblay a Tremblay; 1991). Jinak je tomu u rodu *Abies*, kde existuje relativně vysoká druhová variabilita v preferenci sacharidů pro optimální zrání SE (maltosa- např. *Abies nordmaniana* (Nørgaard, 1997); hybrid *Abies alba x Abies numidica* (Salaj et al., 2004); laktosa- (Schuller a Reuther, 1993; Schuller et al., 2000)). V poslední době, s přibývajícými kultivačními protokoly pro různé druhy jehličnanů, u kterých byla somatická embryogeneze zvládnuta, patří maltosa

mezi stále častěji používané sacharidy a to nejen u druhů rodu *Abies*, ale i dalších (např. *Chamaecyparis obtusa* (Taniguchi et al., 2004); *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2005); *Pinus nigra* (Salajová et al., 1999). Bohužel počet prací, zabývajících se přímo mechanismy, jakými jiné sacharidy než právě sacharosa ovlivňují vývoj SE jehličnanů, bylo publikováno zatím velmi málo.

2. Nutriční role sacharidů během somatické embryogeneze jehličnanů

Celé semeno s vyvíjejícím se zárodkem představuje pro rostlinu jeden z mnoha sinků, do kterého jsou floémem přiváděny z fotosyntetizujících orgánů asimiláty, využívané jako zdroj uhlíku a energie. U různých druhů rostlin se megagametofyt v semeni podílí rozdílnou měrou na regulaci přístupu množství a formy sacharidu transportovaného do bezprostřední blízkosti embrya (např. Weber et al., 1997). Somatická embrya vyvíjející se v umělém prostředí se s tímto problémem musejí potýkat sama, a to bez všech podpůrných funkcí megagametofytu.

Preference sacharidů pro pokrytí metabolických nároků somatických embryí se mohou druhově lišit (Tautorus et al., 1994; Tremblay a Tremblay 1991; Taber et al., 1998). Přesto je ve většině kultivačních protokolů pro somatickou embryogenezi jehličnanů aplikována sacharosa. Téměř všichni autoři se proto zabývají průběhem metabolismu tohoto sacharidu během somatické embryogeneze jehličnanů.

2.1 Metabolismus sacharosy

2.1.1. Klíčové enzymy sacharosového metabolismu

Sacharosa může být využívána rostlinnými pletivy teprve až po své hydrolýze. Tu katalyzují buď invertasy či sacharosasyntasa, jejichž podíl na hydrolýze je závislý na druhu pletiva, jeho funkci a stáří (Sung et al., 1989).

Invertasy (EC 3.2.1.26) existují v rostlinách v různých isoformách s odlišnými biochemickými vlastnostmi a subcelulární lokalizací (Sturm, 1996). Tyto hydrolázy ireversibilně štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu (Sturm, 1999) a jejich aktivita je spojována s buněčným dělením a růstem (Weber et al., 1997). Lze je dělit podle závislosti jejich aktivit na pH, a s tím souvisí i jejich buněčná lokalizace (Sturm, 1999). Kyselé invertasy (optimum pH = 4,5 až 5,0), mezi něž patří vakuolární, apoplastické (iontově vázané)

a extracelulární invertasy, které jsou často nazývány také β -fructofuranosidasy, rovněž hydrolyzují jiné β -fruktosu-obahující oligosacharidy, například rafinosu či stachyosu. Rostliny obsahují ještě dvě další isoformy pro sacharosu specifických cytoplasmatických invertas- neutrální a mírně alkalickou (optimum pH= 7 a 7,5), které jsou unikátní pro rostliny a fotosyntetizující bakterie.

Dalším velmi důležitým cytoplasmatickým enzymem cukerného metabolismu je glykosyltransferasa zvaná sacharosasyntasa (SuSy, EC 2.4.1.13), která za přítomnosti uridindifosfátu (UDP) katalyzuje konverzi sacharosy ve fruktosu a UDP-glukosu (viz. souhrnný článek Sturm a Tang, 1999). Přestože je tato reakce reversibilní, předpokládá se, že se SuSy primárně podílí na štěpení sacharosy (Huber a Huber, 1996; Kruger, 1990). Syntéza UDP-glukosy konzervuje energii štěpené glykosidické vazby sacharosy. Vzniklá UDP-glukosa je substrátem pro syntézu celulosy a kalosy, nebo může vstoupit do jiné metabolické dráhy, kde za přispění enzymů UDPasy a fosfoglukomutasy proběhne reakce: UDP-glukosa + pyrofosfát \leftrightarrow UTP + glukosa-1-P (nebo glukosa-6-P). Vznikající glukosa-1-P nebo glukosa-6-P jsou substráty pro syntézu škrobu (Winter a Huber, 2000) nebo glykolysu. Někdy ovšem může být aktivita SuSy spojena naopak se syntézou sacharosy (Iraqi a Tremblay, 2001b).

Úloha sacharosasyntasy a invertas v regulaci využívání sacharosy je relativně dobře prozkoumána u rostlin krytosemenných. O úloze těchto enzymů v embryonálním vývoji jehličnanů se toho ví podstatně méně (Iraqi et al., 2005).

2.1.2. Dynamika endogenních rozpustných sacharidů a aktivit klíčových enzymů sacharosového metabolismu

V udržovací fázi embryonální suspenzní kultury *Pseudotsuga menziesii* (Taber et al., 1998) a zrání somatických embryí *Picea mariana*, *Picea glauca*, *Pseudotsuga mensiesii* a *Picea abies* (Tremblay a Tremblay 1995; Iraqi a Tremblay 2001a; Taber et al., 1998; Konrádová et al., 2002) a s největší pravděpodobností i u dalších konifer dochází na mediu obsahujícím sacharosu již v průběhu týdenní kultivace k silné hydrolýze sacharosy v mediu. Iraqi a Tremblay (2001a) se domnívají, že právě tato hydrolýza sacharosy způsobená extracelulárním enzymem má za následek vyšší výtěžek embryí obsahujících vyšší množství zásobních proteinů, které následně umožňují vyšší frekvenci klíčení. Ve své následné práci (Iraqi et al., 2005) tito autoři odhalili, že po deseti dnech zrání SE *Picea mariana* je do media kulturou uvolňován protein, jehož molární hmotnost je velmi blízká hmotnosti apoplastické invertasy a že má také invertasovou aktivitu. Iraqi et al. (2005) se domnívají, že tato

extracelulární invertasa spolu s invertasou apoplastickou se podílí u SE *Picea mariana* na využívání sacharidového zdroje kulturou.

Zda jsou embryogenní kultury jehličnanů schopny přijímat intaktní sacharosu, jako například u embryí *Vicia faba*, kde jsou během vývoje semen exprimovány H⁺ sacharosové symportery lokalizované v dělohách zygotických embryí (Weber et al., 1997; Bush, 1999), nebo zda je výsledná endogenní hladina sacharosy dána její resyntézou z přijmutých hexos, zůstávalo u embryogeneze jehličnanů dlouho neznámé. Během zrání somatických embryí *Picea abies* (Lipavská et al., 2000a) byla koncentrace sacharosy v okolí embryí (zbytková ESM) na rozdíl od hexos velmi nízká, z čehož autoři odhadují, že by výsledná koncentrace sacharosy u *Picea abies* mohla být dána převážně její resyntézou. Iraqi a Tremblay (2001b) vzhledem k vysoké aktivitě sacharosafosfátsyntasy (SPS - enzym podílející se na syntéze sacharosy (viz. souhrnný článek Winter a Huber (2000)) a SuSy během zrání SE *Picea mariana* a *Picea glauca* navrhli jak její resyntézu, tak přímý příjem z média. To následně potvrdili (Iraqi et al., 2005) u somatické embryogeneze *Picea mariana*. Pomocí značené sacharosy uhlíkem ¹⁴C a takovému načasování experimentu, aby nedocházelo k hydrolýze sacharosy, zjistili, že během zrání somatických embryí *Picea mariana*, se skutečně příjem intaktní sacharosy na dosažení její endogenní hladiny podílí, nicméně zdůrazňují, že bude potřeba zjistit jakou měrou. Weber et al. (1997) u ZE *Vicia faba* objevili, že k přímému importu sacharosy dochází teprve až s přechodem zrajících embryí do fáze syntézy zásob. Tato schopnost se tedy může v průběhu embryogeneze měnit.

Somatická embrya jehličnanů procházejí během zrání specifickými morfologickými a anatomickými stádii (např. Svobodová et al., 1999), během kterých dochází ke změnám v aktivitách klíčových enzymů cukerného metabolismu a výsledné koncentrace a složení endogenních nestrukturních sacharidů (Iraqi a Tremblay, 2001b; Konrádová et al., 2002).

Během čtrnáctidenní periody na udržovacím mediu (1% sacharosa) u ESM *Picea mariana* i *Picea glauca* byly aktivity invertáz (kyselých i neutrálních) a SPS maximální během pátého až sedmého dne, a poté docházelo k poklesu jejich aktivit. Naproti tomu aktivita SuSy byla nízká a konstantní (Iraqi a Tremblay, 2001b), z čehož autoři usuzují, že sacharosasyntasa sehrává méně důležitou roli v této fázi somatické embryogeneze. Průběhu dynamiky aktivit klíčových enzymů metabolismu sacharidů odpovídala i předpokládaná dynamika obsahu endogenních rozpustných sacharidů s nejvyšší koncentrací hexos rovněž během pátého až sedmého dne, přičemž hladina sacharosy se neměnila. Pro ESM smrku na udržovacím mediu je tedy typická vysoká invertasová aktivita směřující sacharosu k zajištění nutričních potřeb ESM, ale také dynamika aktivit SPS a SuSy, které zřejmě udržují

sacharosový gradient mezi mediem (source) a ESM (sink) (Iraqi a Tremblay, 2001b). K nejvyššímu růstu kultury docházelo ve fázi, ve které byla koncentrace hexos a zároveň aktivita invertas během periody zvýšena (Iraqi a Tremblay, 2001b)

Analýza dynamiky rozpustných endogenních sacharidů v průběhu zrání SE (Lipavská et al., 2000a), s týdenním subkultivačním intervalem na mediu s 3% sacharosu, a semen *Picea abies* (Konrádová et al., 2002; Gösslová et al., 2001) ukázala, že v obou systémech docházelo k poklesu celkového množství sacharidů a k nárůstu poměru sacharosy vůči hexosám. Zrání ZE bylo na rozdíl od SE provázáno navíc syntézou pinitolu (Gösslová et al., 2001). U SE došlo po přenosu na maturační medium k náhlému nárůstu hladiny endogenních sacharidů, který byl způsoben zvýšením koncentrace fruktosy a v menší míře glukosy. Po dosažení kotyledonárního stádia embryí koncentrace hexos (více glukosa), na rozdíl od rostoucí koncentrace sacharosy, klesala. Lipavská et al. (2000a) zjistili, že pozorované koncentrace sacharidů v extirpovaných embryích byla prokazatelně nižší než ve zbytkové ESM. Iraqi a Tremblay (2001b) navzdory odlišnému uspořádání podmínek (skok v koncentraci sacharosy z 1% v proliferačním mediu na 6% v maturačním mediu) dosáhli u *Picea mariana* i *Picea glauca* obdobných výsledků. Nárůst koncentrace sacharidů byl v tomto případě během prvního týdne značný. Tehdy hladina sacharosy dosáhla maximální hodnoty, která se po zbytek zrání SE neměnila, na rozdíl od hexos, jejichž koncentrace klesala. Tento vysoký počáteční nárůst mohl být způsoben velkou koncentrační změnou sacharosy v mediu na počátku zrání. Pokud byla 6% sacharosa v maturačním mediu nahrazena ekvimolární koncentrací glukosy a fruktosy (3,16%), nebyla ovlivněna dynamika sacharosy oproti mediu se 6% sacharosu, nicméně došlo k nárůstu koncentrace hexos. Nahrazení sacharosy za glukosu a fruktosu vyústilo nejen ke snížení kvantity a kvality SE (Tremblay a Tremblay, 1995; Iraqi a Tremblay, 2001a), ale rovněž vážně změnilo dynamiku sacharidového metabolismu (Iraqi et al., 2005).

S dynamikou endogenních sacharidů koreluje během somatické embryogeneze aktivita klíčových enzymů cukerného metabolismu. V raných fázích převažuje mohutné buněčné dělení, doprovázené diferenciací a tvorbou embryonálních struktur, pro které je typická vysoká aktivita invertas doprovázená zvýšenou koncentrací hexos. Posléze (po dvou týdnech zrání) dochází ke snížení aktivit invertas na minimum za současného vzestupu aktivity SuSy lokalizované především v centru SE (Konrádová et al., 2002), či setrvání její aktivity na stejné hladině (Iraqi a Tremblay, 2001b) a zvýšení poměru sacharosa:hexosy za současného snížení celkového obsahu sacharidů a akumulace zásobních látek (Konrádová et al., 2002).

Biochemická, fyziologická a morfologická podobnost ve vývoji SE a ZE je často

považována za dobrý ukazatel vitality a schopnosti SE vyvinout se ve zdravé rostliny (Flinn et al., 1993). Ve vyvíjejících se semenech *Picea abies* v průběhu jejich zrání docházelo k výraznému poklesu koncentrace především glukosy následované fruktosou. V tomto případě klesala i koncentrace sacharosy. Nicméně pokles hexos byl natolik markantní, že poměr sacharosy ku hexosám rostl až na průměrnou hodnotu 7,49 u celého semene a 9,71 u extirpovaného embrya. U somatické embryogeneze bylo dosaženo průměrné hodnoty 0,88 (po působení 3,75% PEGu (4000) v mediu, který proces prohloubil, dosaženo průměrné hodnoty 6,05). Aktivita invertasy byla na rozdíl od SE u ZE téměř neměřitelná, kdežto SuSy vykazovala vysokou aktivitu v megagametofytu s klesající tendencí až do stádia kotyledonárního embrya a v průběhu dalšího vývoje její aktivita rostla v samotném embryu (Konrádová et al., 2002).

Autoři ze srovnání vývoje ZE a SE usuzují, že dobrým indikátorem kvality SE by mohly být vysoké aktivity invertáz v raných fázích vývoje následované vysokou aktivitou SuSy (lokalizované především v embryonálním centru) ve fázi syntézy zásobních látek a postupný pokles koncentrace sacharidů s kumulací sacharosy na úkor hexos (Konrádová et al., 2002)

2.2. Metabolismus ostatních sacharidů somatickými embryi jehličnanů

Ne vždy představuje sacharosa optimální zdroj uhlíku a energie pro somatickou embryogenezi jehličnanů. U některých druhů jehličnanů se dokonce předpokládá, že rychle probíhající metabolismus sacharosy může vést k hypoxii a následné kumulaci etanolu, a tím na kultury působit toxicky (Nørgaard, 1997).

SE *Abies nordmanniana* (Nørgaard, 1997) či hybridu *Abies alba* x *Abies numidica* (Salaj et al., 2004) zrála nejlépe na maturačním mediu s maltosou. Maltosa, stejně jako sacharosa je disacharid a ten musí být nejprve hydrolyzován, aby mohl být buňkou využit. Scott et al. (1995) se domnívají, že prospěšný efekt maltosy může být způsoben její pomalou hydrolyzou (aktivita α -glukosidasy byla až 20x nižší než aktivita invertasová u mikrospor ječmene) a následně vyvolaným mírným nutričním stresem. Bohužel doposud nebyla publikována žádná práce, zabývající se kinetikou hydrolyzy maltosy u jehličnanů. Jiným vysvětlením působení maltosy, by mohl být skok v dostupnosti sacharidů, ke kterému dochází po přenesení z media se sacharosou na medium s maltosou, vyvolávající signál, následně způsobující reorientaci ve vývojovém programu (Koch, 1996).

Schuller a Reuther (1993) zjistili, že rané fáze zrání SE *Abies alba* byla lépe podporována laktosou oproti sacharose, fruktose, glukose nebo galaktose. Schuller et al. (2000) se domnívají, že pozitivní vliv laktosy na zrání SE je způsoben nutričním strádáním kultury. Tuto domněnku podpořila i zjištění, že snížení koncentrace sacharosy v udržovacím mediu vedlo následně k vyšší produkci SE a embrya přenesená na prematurační medium s laktosou již dále neproliferovala a hnědla. Přesto tyto kultury produkovaly nejvyšší množství embryí. Další průběh zrání SE *A. alba* byl podpořen působením maturačního média s 200mM laktosou a 14-29 mM sacharosou. Hypotéze nutričního strádání odpovídá zjištění Reuthera et al. (1995), kteří zjistili, že hydrolýza laktosy v ESM jedle probíhá pomalu.

Zdá se, že působení laktosy zpomalilo probíhající proliferaci kultury a naopak podpořilo diferenciaci buněk (Schuller et al., 2000). Podobně i Steiner et al. (2005) pozorovali formaci morfologicky vyspělejších somatických proembryí *Araucaria angustifolia* při indukci a následné proliferaci na mediu s maltosou. Tato proembrya poté daleko lépe zrála oproti proembryím indukovaným a proliferujícím na mediu se sacharosou, kde na rozdíl od media s maltosou ESM proliferovala daleko rychleji. V tomto případě bylo působení maltosy během indukce a udržovací fáze ESM klíčovým bodem pro morfologickou reorganizaci a histodiferenciaci embryogenních buněk v další vývojová stádia SE.

2.3. Vliv sacharidů aplikovaných do média na tvorbu a ukládání zásobních látek u somatických embryí jehličnanů

Akumulace adekvátních rezerv je pro SE jehličnanů zásadní, protože klíčící rostliny se musejí obejít bez podpory celého megagametofytu, který představuje hlavní zásobní orgán u semen jehličnanů (Misra a Green, 1990). Z tohoto důvodu je schopnost konverze v rostlinu a její další optimální růst očekáván u těch zralých SE, která si vytvořila největší množství zásobních látek (Attree a Fowke, 1991) tj. lipidů (např. Attree a Fowke., 1992; Carrier et al., 1997), zásobních proteinů (Hakman 1993; Misra 1994) a sacharidů (Lipavská et al., 2000; Iraqi et al., 2005). Kvalita i kvantita zásobních látek SE jehličnanů může být ovlivněna koncentrací a druhem exogenně aplikovaného sacharidu.

Hlavními zásobními proteiny rodu *Abies* jsou proteiny o hmotnostech 43, 28 a 16 kDa. Pokud byla aplikována do media během zrání SE hybridu *Abies alba* x *Abies numidica* sacharosa s PEG (4000), nebo glukosa spolu s PEG (4000), docházelo ke zvýšení zastoupení zásobního proteinu o hmotnosti 16 kDa v SE oproti mediu s maltosou a PEG (4000), kde se hladina tohoto zásobního proteinu oproti mediu pouze se sacharosou neměnila. Maltosa v

mediu bez PEG podporovala navýšení frakce proteinu o hmotnosti 28,5 kDa ve srovnání s médiem s 3% sacharosou. U tohoto hybridu jedle zrála SE nejlépe na mediu s maltosou a PEG (4000). (Salaj et al., 2004)

U zrajících SE *Picea mariana* a *Picea glauca* způsobila náhrada 6% sacharosy v mediu za 3,16% glukosu a 3,16% fruktosu pokles v hromadění zásobních proteinů (Iraqi a Tremblay, 2001a) a škrobu (Iraqi a Tremblay, 2001b) oproti mediu se 6% sacharosou. Na hladinu endogenní sacharosy, kterou lze také považovat za zásobní sacharid u SE jehličnanů (Lipavská et al., 2000), neměla záměna sacharosy za glukosu a fruktosu vliv (Iraqi a Tremblay, 2001b). Pokud byla nahrazena 3% sacharosa v mediu při zrání SE *Picea abies* ekvimolárním množstvím glukosy a fruktosy (1,58%), došlo po 7 týdnech zrání k výraznému poklesu hladiny lipidů oproti SE zrajícím na 3% sacharose (Grigová, 2003).

3. Signální úloha sacharidů

Dnes existuje mnoho nezvratitelných důkazů prokazujících signální úlohu sacharidů u rostlin. Dřívější evidence naznačovaly vliv sacharidů na změny enzymových aktivit, metabolismu a vývoje, které byly tehdy považovány za metabolický efekt. Tato data nebyla dávana do přímého kontextu se změnami genové exprese. K tomu došlo až poté, kdy byla v pokusech s nemetabolisovatelnými nebo částečně metabolisovatelnými analogy hexos naznačena přítomnost specifického signál-vnímajícího (signal-sensing) a transdukčního mechanismu, nezávislého na katabolismu sacharidů (Jang a Sheen, 1994). Dnes je cukerná signalizace u rostlin považována za komplexní signalizační síť interagující se signalizačními drahami fytohormonů a ovlivňující rostlinu během celé její ontogeneze (Rolland a Sheen, 2005).

Studium cukerné signalizace u rostlin vychází z poznatků získaných na kvasinkách (nejčastěji *Saccharomyces cerevisiae*), u kterých je tato problematika lépe rozpracována (např. Halford et al., 1999; Koch et al., 2000; Loreti et al., 2001). Nicméně je důležité si uvědomit několik zásadních rozdílů mezi těmito organismy. U obou vyvolávají cukry cukerné signály, které působením na citlivé geny (sugar-responsive genes) umožňují přizpůsobit se měnícím se vnějším podmínkám, avšak u rostlin (mnohobuněčných) se tak děje na úrovni komplexních struktur. U rostlin a ostatních mnohobuněčných organismů cukrem-regulované geny neposkytují pouze možnost integrace buněčné odpovědi na dostupnost sacharidů pro buňku samotnou (Koch, 1996), ale také pro koordinaci změn ve využívání

sacharidů a jejich rozdělení a směřování do různých rostlinných částí (Koch, 1996; Rolland a Sheen, 2005). U rostlin je dokonce možno pozorovat určitý „buněčný altruismus“, ke kterému dochází při energetickém strádání pletiv, kdy u některých heterotrofních buněk vlivem hladem-indukovaných změn v genové expresi převáží export sacharidů z buňky nad importem, a tím umožní výživu klíčových buněk a pletiv v rostlině (Koch, 1996). To předpokládá sjednocení nejméně dvou aktivit: export z jedné buňky a import do jiné. Důležitou roli zde proto sehrávají sacharidové translokátory a jejich regulace (Bush, 1999; Lalonde et al., 1999).

3.1. Cukerná signalizace u rostlin

Cukerná signalizace u rostlin je zkoumána pomocí genetických, proteomických, molekulárních, biochemických, fyziologických a buněčných přístupů a jejich kombinacemi (Smeekens, 2000).

U rostlin se předpokládá schopnost vnímat vícero sacharidů a reagovat na jejich extra či endocelulární hladiny (Loreti et al., 2001). Zatím se však u rostlin uvažuje o přítomnosti tří systémů cukerné signalizace založených na percepci sacharosy a hexos (Koch, 1996, Lalonde et al., 1999; Halford et al., 1999; Smeekens, 2000; Koch, 2000; Rolland et al., 2002; Gonzali et al., 2006). (Gonzali et al., 2006) na základě známých literárních údajů navrhuji existenci:

- sacharosa-specifického signalizačního mechanismu
- hexosa-specifického signalizačního mechanismu nezávislého na hexokinase
- hexosa-specifického signalizačního mechanismu na hexokinase závislého

Ve specifickém signalizačním systému citlivém k hexosam („hexosa-sensing systém“) sehrávají důležitou úlohu hexokinasy, které jsou kromě své důležité enzymatické funkce v glykolyse považovány za intracelulární senzor monitorující hladinu hexos (Jang a Sheen, 1994, 1997; Lalonde, 1999; Halford et al., 1999; Rolland et al., 2002; Rolland a Sheen, 2005). Různé druhy rostlin mohou mít rozdílný počet genů pro hexokinasy (Cho et al., 2006). Produkty těchto genů se nalézají v různých kompartmentech buňky, mohou být specifické jen pro některé rostlinné orgány (Cho et al., 2006) a podílejí se na tvorbě vysokomolekulárních proteinových komplexů (Moore a Sheen; Cho a Sheen, nepublikované práce- z Rolland a Sheen, 2005). Zda a do jaké míry je tato kompartmentace důležitá pro signalizaci se zatím

neví (Rolland a Sheen, 2005). Dle pokusů s různými analogy glukosy schopnými podstoupit sled kroků glykolýzy pouze do určitého stadia (Jang a Sheen, 1994) se předpokládá, že je hexokinasami spíše vnímána rychlost fosforylace hexos (Lalonde et al., 1999), než samotná koncentrace hexos v buňce.

Kvasinky mají ve své cytoplasmatické membráně proteiny (SNF3, RGT2), které jsou homologní k jejich hexosovým transportérům cytoplasmatické membrány, ale na transportu se nepodílejí a slouží jako senzory extracelulární koncentrace sacharidů. Tyto senzory jsou schopné regulovat expresi genů hexosových transportérů s různou afinitou k hexosám, a tím se podílejí na regulaci transportu hexos do buňky (Halford et al., 1999; Lalonde et al., 1999). Předpokládá se, že hexokinasa (intracelulární senzor) ovlivňuje u kvasinek expresi těchto senzorů (Lalonde et al., 1999). Podobné membránové senzory pro percepci koncentrace hexos jsou přítomny i u rostlin, ale jejich molekulární podstata zůstává zatím neznámá (Lalonde et al., 1999; Smeekens, 2000). Nicméně se předpokládá jejich účast v hexosa-specifické signalizační dráze nezávislé na hexokinasach. Mezi geny regulované u rostlin touto drahou patří například geny *invertas* nebo *sacharosasyntas* (Koch et al., 2000).

Předpokládá se, že glukosa a sacharosa kontrolují rozdílné regulační dráhy (Lalonde et al., 1999). Glukosa působením na své senzory inhibuje geny podílející se na fotorespiraci, syntéze mastných kyselin a jejich mobilizaci a aktivuje geny sacharosového metabolismu, respirace, geny syntézy buněčné stěny a škrobu (Rolland a Sheen, 2005). Recentní studie Cho et al. (2006) ukazuje, že samotná exprese hexokinas v listech *Oriza sativa* je regulována přítomnými hexosami působícími přes své senzory. Tito autoři se také domnívají, že se hexokinasy podílejí na sugar-sensing procesech během raných embryonálních vývojových stádií rýže.

Sacharosa kontroluje expresi mnoha genů. Reprimuje transkripci fotosyntetických genů, například pro ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasaoxygenasu (Rubisko), plastocyanin, chlorofyl a/b vazebný protein (Dijkwel et al., 1996, 1997) nebo reguluje *rolC* promotor z *Agrobacterium rhizogenes* (Yokoyama et al., 1994). Bush (1999) se domnívá, že sacharosuvnímající senzor a následná signální transdukční dráha kontroluje zásobení floému regulací aktivity sacharosových H⁺ symportérů. U sacharosa-specifických signalizačních drah je velmi obtížné odhalit přímou funkci sacharosy, vzhledem k probíhající hydrolyze sacharosy v rostlině. Ta zvyšuje hladinu hexos, a tím způsobuje i generování rozdílného cukerného signálu. Rovněž pokud jsou rostlině dodávány hexosy, syntetizuje se z nich sacharosa, a nelze tak pozorované změny připisovat pouze působení hexos (Loreti et al., 2000, 2001). Navíc výběr různých analogů sacharosy (netransportovatelné, nemetabolisovatelné atd.) je

omezenější, než v případě analogů glukosy. Sinha et al. (2002) zjistili, že jimi použité analogy sacharosy (palatinosa a turanosa- netransportovatelné analogy; fluorosacharosa-nehydrolyzovatelný analog) aktivovaly rozdílné signální transdukční dráhy oproti sacharose. Spouštěly obranné mechanismy podobně těm, které byly aktivovány některými elicitory. To nicméně demonstruje komplexitu sacharidem-zprostředkovaných regulačních mechanismů.

Loreti et al. (2000) objevili, že obecně pro percepci disacharidů je důležitější fruktosová polovina molekuly disacharidu. Ale i jiné sacharidy např. trehalosa (α -D-glukopyranosyl-1,1- α -D-glukopyranosid) je rostlinou vnímána (Avonce et al., 2005).

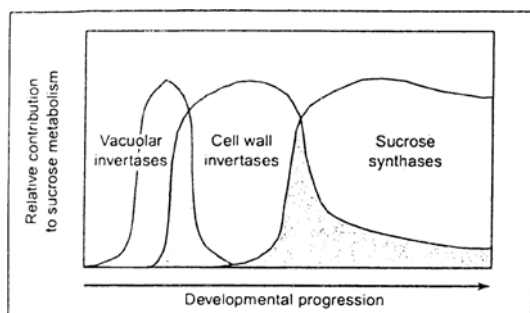
Nedostatek sacharidů v rostlinných buňkách obecně vede k zesílení exprese genů fotosyntézy, genů pro mobilizaci rezerv a exportních procesů, kdežto jejich nadbytek zesiluje expresi genů pro tvorbu zásobních látek a využívání sacharidů (Jang a Sheen., 1994; Koch, 1996- soupis genů tam; Lalonde et al., 1999; Rolland a Sheen, 2005). Tyto efekty posilují domněnku, že cukr-responsivní geny poskytují způsob pro rozvržení toku sacharidů v rámci rostliny a způsobují tak změny na morfologické úrovni (Koch, 1996), a umožňují tím plasticitu vývojového programu rostliny (Rolland a Sheen, 2005).

O transdukčních drahách v cukerné signalizaci se toho ví podstatně méně než o vlastní percepci. Tyto dráhy zahrnují proteinkinasy a proteinfosfatasy a předpokládá se zapojení dalších mediátorů jako Ca^{2+} , kalmodulinu (Smeekens, 2000) nebo proteinu 14-3-3 (Rolland et al., 2002). U rostlin byla prokázána přítomnost SNF1-like protein kinasových komplexů (SnRKs), které jsou homology kvasinkového SNF1 (název ze sucrose nonfermenting-1 gene) (Rolland et al., 2002). Produkt SNF1 genu je esenciální pro derepresi všech glukosa-reprimovaných genů u kvasinek za dostatku glukosy (Halford et al., 1999; Smeekens et al., 2000). Předpokládá se, že SnRKs jsou nejen prostředníky mezi cukernou percepcí a změnou genové exprese, ale rovněž kontrolují aktivity mnoha enzymů. Mezi ně patří například nitrátreduktasa, nebo SPS (více souhrnné články Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002).

Geny invertas jsou samy cukr-responsivní (Roitsch et al., 1995; Lalonde et al., 1999; Iraqi et al., 2005) stejně jako geny sacharosasyntas (Lalonde et al., 1999) a jejich produkty svými enzymatickými aktivitami ovlivňují další cukrem-regulované geny (Koch et al., 1996; Roitsch et al., 1999), tudíž i sebe sama (Koch, 2004). Koch (2004) přichází s hypotézou, podle které metabolismus sacharosy leží u rostlin v centru citlivého seberegulačního vývojového systému u rostlin.

Pletiva sinku v rostlině mohou přijmout sacharosu z floému dvěma možnými cestami, přičemž jedna z nich vede přes apoplast (obsahující apoplastické invertasy), druhá je symplastická. Tím se může odlišovat místo, kde dochází k hydrolýze sacharosy. Tohle vše

vede ke generování různých signálů, které mohou spouštět různé cukr-senzitivní dráhy vzhledem k různému rozmístění cukerných sensorů v rámci buňky (Lalonde et al., 1999; Koch, 2004). Například v semenech, kde neexistuje plasmodesmální spojení mezi pletivem mateřské rostliny a semenem, apoplastické invertasy (které jsou u rostlin vývojově a orgánově velmi specifické (Roitsch et al., 2003)) významně zvyšují hladinu hexos v extracelulárním prostoru (Wobus a Weber, 1999). Tuto aktivitu si SE jehličnanů zachovávají (např. Tremblay a Tremblay, 1995; Taber et al., 1998). Pokud je sacharosa transportována do buňky, signál, který zde může vyvolat závisí na tom, jaký enzym ji rozštěpí, protože invertasy jsou schopny produkovat dvě hexosy (tj. silnější signál) oproti jedné (fruktose) a UDP-glukose po štěpení sacharosasyntasou (např. Zeng et al., 1999).



obr. č. 1) Obecný průběh aktivit enzymů štěpících sacharosu při přechodu ze sinku metabolického na sink zásobní (upraveno, Koch, 2004)

Hexosy stimulují buněčné dělení a expansi, kdežto sacharosa podporuje diferenciaci a zrání, což vedlo k hypotéze o invertasa-sacharosasyntasové kontrole významných vývojových stádií u rostlin (Weber et al., 1997; Wobus a Weber, 1999; Smeekens, 2000; Koch, 2004). Podle této hypotézy invertasy svou aktivitou navozují tvorbu a expansi nových

sinků. Později dochází k přechodu do fáze ukládání zásob a zrání, která je typická vysokou aktivitou SuSy. Celý proces je doprovázen poklesem poměru hexos ku sacharose v pletivech. Při analýze dynamiky endogenních hladin rozpustných sacharidů ve zrajících somatických embryích *Picea abies* (Konrádová et al., 2002) a dynamiky klíčových enzymů metabolismu těchto sacharidů, byl pozorován obdobný trend. Předpokládá se, že role glukosy a sacharosy v průběhu embryogeneze jsou rozdílné (Weber et al., 1997; Gibson, 2004).

Sacharidy mohou rostlině pravděpodobně sloužit jako morfogeny poskytující poziční informaci mašinérii buněčného cyklu a různým vývojovým programům (Rolland et al., 2002; Gibson, 2004). Například u embryí *Vicia faba* prostorově korelovaly gradienty sacharidů s mitotickou aktivitou (Borisjuk et al., 1998). Podobně exprese cyklinu D u *Arabidopsis thaliana* byla regulována sacharidy (Riou-Khamlichi et al., 2000)

Existuje stále ještě mnoho mezer v pochopení sítě cukerné signalizace. Bude potřeba odhalit nejprve funkce všech buněčných sensorů pro sacharidy, dále působení proteinkinas, proteinfosfatas a dalších prostředníků transdukčních drah cukerné signalizace (Rolland et al., 2002). Také musejí být prozkoumány signalizace dalších sacharidů nežli právě hexos nebo

sacharosy. V závěru celého snažení bude potřeba se pokusit o pochopení interakcí těchto signalizačních drah s ostatními signalizačními drahami v buňce.

3.2. Interakce cukerné signalizace s rostlinnými hormony

Dnes je hexokinasa považována za evolučně konzervovaný senzor pro glukosu, který u rostlin integruje světelnou, hormonální a nutriční signalizaci v průběhu růstu a vývoje (Rolland a Sheen, 2005). Embryogeneze, klíčení semen a raný vývoj klíčících rostlin patří mezi nejdůležitější vývojové procesy, u kterých je vzájemné ovlivňování transdukčních signálních drah fytohormonů a sacharidů zkoumáno (Gibson, 2004). K výzkumu jsou využíváni tzv. cukr-responsivní mutanti. U divokých forem rostlin dochází na mediu s vysokou koncentrací sacharidů (např. 300 mM glukosa, sacharosa) k zastavení vývoje mladých klíčících rostlin (Gibson, 2004). Pomocí tzv. cukr-responsivních selekcí lze odhalit hypersensitivní, či resistentní cukr-responsivní mutanty. Hypersensitivní mutanti zastavují svůj růst při nižší koncentraci sacharidů v médiu než v případě divoké formy, naopak resistentní rostou i při vyšších koncentracích sacharidů v mediu, při kterých divoké formy nerostou (seznam mutantů viz. Rook a Bevan, 2003; Gibson, 2004). V průběhu analýzy hypersensitivního mutantu *Arabidopsis prl 1* se zjistilo, že je rovněž hypersensitivní k cytokininům, k. abscisové, etylenu a auxinu (Németh et al., 1998). Dále se ukázalo, že někteří z těchto mutantů *Arabidopsis* jsou alelickými mutanty v jednom z genů biosyntézy kyseliny abscisové či etylenu (Rook a Bevan, 2003; Gibson 2004). Tyto důkazy naznačují velmi těsné interakce mezi signalizačními drahami cukrů a fytohormonů (Rook a Bevan, 2003). Žádná z těchto prací však nebyla provedena na jehličnanech nebo dokonce klíčících SE jehličnanů, kde jsou právě exogenní sacharidy a růstové regulátory považovány za nejdůležitější komponenty média (Lipavská et al., 2004).

3.3. Signální úloha sacharidů v průběhu somatické embryogeneze jehličnanů

Iraqi a Tremblay (2001a, b; Iraqi et al., 2005) uskutečnili řadu pokusů pro pochopení role sacharosy v mediu při zrání somatických embryí *Picea mariana* a *Picea glauca*. Zjistili, že výnos a kvalita embryí na maturačním mediu obsahujícím 6% sacharosu, která byla kulturou postupně hydrolyzována apolastickou a především extracelulární invertasou (Iraqi et al., 2005) na glukosu a fruktosu, byly jednoznačně vyšší než na mediu obsahujícím 3,16% glukosu a zároveň 3,16% fruktosu. Pro zabránění kompletní hydrolyze sacharosy kulturou, realizovali Iraqi a Tremblay denní přenos kultury na čerstvé medium, což způsobilo

jednoznačný pokles výnosu embryí. Tato redukce nebyla zapříčiněna manipulací s kulturou během přenosu, protože denní transfer *in situ* neměl na produkci embryí vliv (Iraqi a Tremblay, 2001a). Nahrazení sacharosy v mediu glukosou a fruktosou mělo dalekosáhlé následky nejen v dynamice endogenních nestrukturních sacharidů (hladina sacharosy zůstala konstantní oproti hexosám, jejichž hladina se zvýšila, množství škrobu se redukovalo), ale rovněž i v dynamice klíčových enzymů metabolismu těchto sacharidů (aktivita kyselých i alkalických invertas se snížila, aktivita SuSy vzrostla). Tohle ošetření rovněž zapříčinilo pokles v obsahu rozpustných i nerozpustných proteinů v embryích (Iraqi a Tremblay, 2001b). Autoři se proto domnívají, že pool hexos pocházející z jejich přímého přijetí z kultivačního média nemůže podpořit stejný vývoj embrya, jako pool hexos přirozeně produkovaných štěpením sacharosy prostřednictvím invertas. Iraqi a Tremblay (2001b) navrhuji, že sacharosa může sloužit jako regulační faktor během zrání somatických embryí stimulující syntézu zásobních proteinů, hlavně 42, 35 a 22 kDa. Dále potvrzují (v souladu s Koch, 1996), že i u rodu *Picea* nadbytek sacharosy stimuluje aktivitu invertas vlivem působení sacharosy na korespondující geny (Iraqi a Tremblay 2001b; Iraqi et al., 2005). Nicméně Lipavská et al. (2004) se domnívají, že spíše zvýšený obsah glukosy (fruktosy) v mediu (medium s 3,16 % fruktosy a glukosy) a následně jejich zvýšený obsah v embryích mohl být příčinou zhoršeného vývoje (snad vlivem hexosové signalizace), nežli samotný proces hydrolýzy sacharosy či sacharosové signalizace. Dále se domnívají, že zhoršený vývoj embryí jejich denním transferem nemusel být způsoben absencí pozitivního působení hydrolýzy sacharosy, protože takovéhle uspořádání pokusu se muselo projevit i v dostupnosti jiných komponent v mediu. Zvláště způsobené změny v koncentraci ABA v mediu mohly mít velký vliv.

Schuller a Reuther (1993) pozorovali během zrání na mediu s laktosou předčasnou syntézu chlorofylu u SE *Abies alba*, kterou vysvětlili jako předčasné stárnutí SE vlivem nutričního strádání. Stejný jev byl pozorován i u zrajících embryí hybridu *Abies alba* x *Abies numidica* na mediu s maltosou (Salajová et al., 2004). Zde je velmi zajímavé podívat se na problém z hlediska cukerné signalizace za předpokladu (Reuther et al., 1995), že hydrolýza laktosy (a tedy produkce potenciálního signálu) oproti sacharose probíhá pomaleji. S jiným řešením tohoto problému přišli Attree et al. (1994, 1995). Ti vysvětlují předčasné zelenání pozorované při zrání SE *Picea glauca* interakcemi k. abscisové, která brání předčasnému klíčení a syntéze chlorofylu (například Hoekstra et al., 2001), s různými komponentami media (Attree et al., 1994, 1995). Domnívají se proto, že optimální koncentrace ABA se může lišit v závislosti na složení media. Účinek ABA může být zvýšen stoupající koncentrací sacharosy

v mediu, což bylo pozorováno u SE *Picea mariana* a *Picea rubens* (Tremblay a Tremblay, 1991).

4. Sacharidy a jejich osmotická úloha v somatické embryogenezi jehličnanů

Druh použitého osmotika ve spojení s ABA silně ovlivňuje zrání SE jehličnanů (Attree a Fowke, 1993; Stasolla et al., 2002). Osmotika užívaná v somatické embryogenezi lze rozdělit do dvou skupin: na penetrující (nízkomolekulární- např. cukry, aminokyseliny, anorganické sole) a nepenetrující (polyetylglykol (PEG)- nejčastěji Mr = 4000 či dextransy), které vzhledem ke svým molekulárním rozměrům nejsou schopné pronikat skrze rostlinnou buněčnou stěnu. Avšak i zde existují výjimky. Newton et al. (1990) zjistili, že kalusy *Sorghum bicolor* a *Pinus taeda* PEG (Mr = 8000) z média přijímaly. Rozdíl mezi penetrujícími a nepenetrujícími osmotiky spočívá i v odpovědi buňky na jejich působení. Penetrující způsobují plasmolysu buňky a po jejich vstupu do cytosolu dochází k osmotickému vyrovnání, oproti nepenetrujícím, které navozují obdobný vodní stres jako při desikaci (Attree a Fowke, 1993).

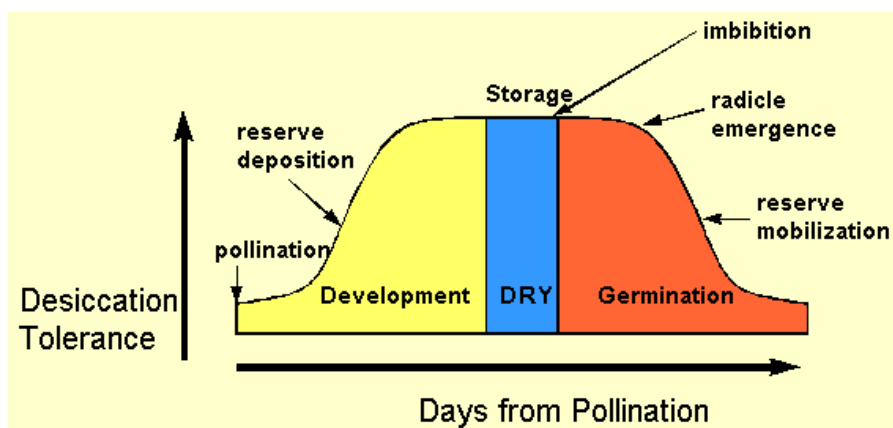
Prospěšný efekt zvyšující se koncentrace sacharosy na zrání SE *Picea mariana* a *Picea rubens* je považován za částečně osmotický, protože substituce poloviny koncentrace sacharosy za jiné osmotikum (manitol, myo-inositol, sorbitol) neměla vliv na množství produkovaných embryí (Tremblay a Tremblay, 1991). Manitol působil prospěšně v některých fázích zrání SE *Picea glauca engelmanni* (Roberts, 1991). Podporoval tvorbu globulárních embryí, akumulaci zásobních proteinů, zamezil předčasnému klíčení, ale potlačoval tvorbu embryí kotyledonárních. Během zrání SE *Picea mariana* zřejmě zamezil nežádoucí proliferaci na maturačních mediích s nízkými koncentracemi sacharosy (Tremblay a Tremblay, 1995). Lipavská et al. (2004) se však domnívají, že interpretace těchto dat je poněkud problematická. Podle nich některá nízkomolekulární osmotika nemusejí být zcela inertní (Lipavská a Vreugdenhil, 1996), mohou být přirozenou součástí některých rostlin. Například embryogenní kalus (Swedlund a Locy, 1993).

Attree et al. (1995) ukázali, že zrání somatických embryí *Picea glauca* probíhalo lépe na mediu s vysokomolekulárními osmotiky než s nízkomolekulárními. Proto se dnes v somatické embryogenezi používá především vysokomolekulární PEG, který má na SE podobné účinky jako přirozený vodní stres, jaký se vyskytuje v semeni (Attree a Fowke,

1993). Jeho pozitivní působení na zrání somatických embryí různých druhů jehličnanů bylo popsáno mnoha autory (Attree et al., 1992; Nørgaard, 1997; Kong et al., 1998; Vooková et al., 1998; Svobodová et al., 1999; Lipavská et al., 2000a; Salajová et al., 2004). PEG spolu s ABA podporoval akumulaci zásobních lipidů (Attree et al., 1992) a zásobních proteinů (Misra et al., 1993) v SE *Picea glauca*. PEG měl také pozitivní vliv na formování obou pólů nezralých SE *Picea glauca* (Stasolla et al., 2003). U SE *Picea abies* PEG zrání embryí urychlil a pozitivně ovlivňoval tvorbu kořenové čepičky. Na druhou stranu ale způsoboval tvorbu trhlin v centru SE (Svobodová et al., 1999). Kong a Yeng (1995) prokázali stimulační působení polyethylenglykolu ($M_r = 3350$) na syntézu ABA u SE jehličnanů. Právě tímto působením je často vysvětlován pozitivní vliv PEGu na somatickou embryogenezi jehličnanů (Stasolla et al., 2002). Řada autorů ale mluví o negativním působení PEGu, které se projevuje zejména poruchami při klíčení a následné konverzi SE (Kong and Yeung, 1995; Find, 1997; Bozhkov and von Arnold, 1998)

5. Ochranná funkce sacharidů

Vývoj semen mnoha rostlin je doprovázen postupným působením vodního stresu. Výsledná snížená hladina vody v (ortodoxních) semenech prodlužuje období metabolického klidu, a tím i jejich životnost. Po následné rehydrataci tato semena lépe klíčí a klíčící rostliny lépe rostou. (Kermode 1990). Aby semena (embrya) přežila proces desikace, tj. navození stavu, ve kterém obsah vody v semeni může klesnout až pod 10% obsahu výchozího, musejí být k desikaci tolerantní. K nabytí této tolerance, která je součástí maturačního programu, dochází před vysycháním semene (např. Golovina et al., 2000) viz. obr 2. Zdá se, že hlavní roli vedle jiných potřebných stimulů v sekvenci událostí vedoucí k získání tolerance k desikaci hraje ABA (Hoekstra et al., 2001).



obr. č. 2) Nabytí a ztráta desikační tolerance u ortodoxních semen (převzato z McKersie, 1996)

Proto, aby SE jehličnanů zdárně klíčila je také často zapotřebí, aby prošla fází desikace (Roberts et al., 1990; Attree a Fowke, 1993). SE nabývají tolerance k desikaci působením ABA v kombinaci s působením subletálního stresoru - vodního stresu způsobeného zvýšenou koncentrací PEGu, sacharosy, dále tepelným šokem nebo chladovým působením (odkazy viz. Pond et al., 2002; Hoekstra et al., 2001). Attree et al. (1995) navodili toleranci k desikaci SE *Picea glauca* působením maturačního media (obsahuje ABA) a 7,5% PEGu ($M_r=4000$), což vedlo u embryí k poklesu obsahu vody z 96% na 47%, a posléze umístěním do prostředí se sníženou relativní vlhkostí vzduchu. Jako velmi důležitý faktor v nabývání tolerance k desikaci se projevila rychlost vysychání SE (Bomal et al., 2002; Attree et al., 1995). Částečná pomalá ztráta obsahu vody pod 55% u SE *Picea glauca* (Attree et al., 1995), nebo pod 45 % u SE *Picea mariana* (Bomal et al., 2002), vedla k získání plné tolerance k rychlému vysychání. SE *Picea glauca*, která byla vystavena rychlé desikaci po osmém týdnu zrání na maturačním mediu s ABA a PEG, dospěla k obsahu vody 5% a stavu netabolického klidu. Takto ošetřená embrya byla zmrazena a uchována při -20°C po dobu jednoho roku. Po roce embrya klíčila bez problémů (Attree et al., 1995). Uchování SE ve stavu klidu po delší dobu by v průmyslové produkci umožnilo celoroční produkci SE a synchronizovanou výsadbu rostlin v příznivém ročním období.

Studie kvality semen odhalily významnou úlohu sacharidů v získání tolerance k desikaci a tolerance k nízkým teplotám (Bernal-Lugo a Leopold, 1995). Jak u somatické (Lipavská et al., 2000a), tak i zygotické embryogeneze *Picea abies* (Gösslová et al., 2001) byl pozorován postupný úbytek celkové hladiny endogenních nestrukturních sacharidů na maturačním mediu s postupným nárůstem zastoupení sacharosy. Aplikací PEGu ($M_r=4000$) byla tato tendence ještě dále prohloubena (Konrádová et al., 2002). ZE na rozdíl od SE

obsahovala během zrání pinitol. Po dokončení morfologických změn se v ZE začaly kumulovat oligosacharidy rafinosové řady (RFO). RFO - zde rafinosa a stachyosa představovaly až 50 % z celkového množství sacharidů u ZE (Gösslová et al., 2001).

RFO (α -1,6-galaktosyl_n-sach; $1 \leq n < \text{cca } 7$) jsou běžně se vyskytující složky vyšších rostlin převážně v zásobních orgánech a semenech (Bachmann et al., 1994; Obendorf 1997; Muzguiz et al., 1998). V semenech se RFO začínají kumulovat v pozdních fázích vývoje (Black et al., 1996; Brenac et al., 1997). Přestože je v poslední době problematika RFO intenzivně zkoumána, jejich fyziologické funkce zůstávají zatím stále sporné. U mnoha rostlin slouží jako zásobní a transportní forma sacharidu (např. Bachman et al., 1994) a také se podílejí na mnoha stresových reakcích. Hromadění RFO u rostlin pozitivně koreluje s působením chladu (Bachman et al., 1994; Lipavská et al., 2000b; Konrádová et al., 2003), horka a tolerancí k desikaci (Downie a Bewley 2000, Bomal et al., 2002). Zde je ovšem nutno zmínit, že Black et al. (1999) pozorovali u embryí pšenice nabytí tolerance k desikaci bez přítomnosti RFO po ztrátě velmi malého množství vody. Avšak v jiných případech se zdá, že RFO zastávají ve vyvíjejících se semenech důležitou úlohu (např. Sun et al., 1994; Bernal-Lugo a Leopold, 1995; Bachman et al., 1994) a umožňují toleranci k vodnímu stresu ještě před jejich plnou zralostí (Black et al., 1996; Brenac et al., 1997). Bernal-Lugo a Leopold (1995) prokázali, že životnost semen roste s poměrem RFO: sacharosa. Jedním z důsledků působení desikace na SE *Picea abies* a *Picea mariana* je právě kumulace RFO (Kumštýřová et al., 2000; Bomal et al., 2002). Konrádová et al. (2003) indukovala kumulaci RFO u SE *Picea abies* pomocí chladového působení.

Na počátku klíčení semen dochází k rychlé degradaci RFO (Koster a Leopold 1988; Downie a Bewley, 2000; Konrádová et al., 2003), a proto se předpokládá, že tyto sacharidy mohou sloužit také jako zdroj uhlíku a energie pro klíčící rostlinu. Koster a Leopold (1988) zjistili, že v průběhu této doby dochází rovněž ke ztrátě tolerance k desikaci (viz. obr. 2). Desikačním ani chladovým ošetřením zatím nebylo dosaženo kumulace RFO u SE jako u ZE. Otázkou zůstává, zda by u SE zvýšení poměru RFO : sacharosa odpovídající stavu u ZE vedlo k produkci kvalitnějších SE. Pokud ano, bylo by možné aplikovat obě tyto metody a následně se pokusit, se znalostmi dynamik aktivit enzymů štěpících RFO, zvýšit endogenní hladiny aplikací RFO do média.

Tolerance k desikaci u kvasinek, hub a některých živočichů je spojována s ochrannou funkcí trehalosy na buněčné struktury těchto živočichů (Crowe et al., 1984). Tuto funkci trehalosy u rostlin zastupuje sacharosa a částečně RFO (Caffrey et al., 1988; Koster a Leopold, 1988). Pokud by rostlina postrádala ochranné mechanismy svých membrán a

proteinů, docházelo by během desikace k jejich narušení, vedoucí při následné rehydrataci ke zvýšené permeabilitě membrán, denaturaci proteinů, unikání iontů, zmenšení membránového potenciálu (McKersie a Stinson, 1980; Koster a Leopold, 1988) končící postupným vyčerpáním buňky a její smrtí. Sacharidy jsou svými OH– skupinami schopné napodobit interakce fosfolipid-voda nebo protein-voda. Tím zůstává stavební princip membrán (hydrofilní dvojvrstva s hydrofóbním vnitřním prostředím mezi nimi) zachován (Caffrey et al., 1988; McKersie a Stinson, 1980).

Snižování obsahu vody v semeni vede k enormním koncentracím solutů, které mají snahu krystalizovat (Williams a Leopold, 1989). Pokud dojde ke krystalizaci sacharosy, je ztracena její ochranná funkce. Caffrey et al. (1988) zjistili, že RFO mohou zabránit krystalizaci sacharosy v buňce. Proto se předpokládá, že poměr RFO: sacharosa je důležitější než celkový stav sacharidů v buňce. Například embrya rýže nabyly tolerance k desikaci po dosažení poměru sacharosa ku RFO 20:1 (Brenac et al., 1997). Sacharosa za přítomnosti RFO nekrystalisuje a navozuje v cytoplasmě stav o vysoké viskozitě- tzv. vitrifikaci (glassy state). Vitrifikace uchovává vodíkové vazby mezi molekulami vody a hydrofóbními skupinami makromolekul, zabraňuje pohybu organel i molekul a způsobuje pokles metabolické aktivity (Williams a Leopold, 1989; McKersie, 1996). Tento stav přetrvává v semeni i při snížení teploty pod – 200°C, aniž by došlo k iniciaci tvorbě ledu uvnitř buněk (McKersie, 1996). Tento stav také umožňuje kryoprezervaci kultur. Kryopresevace je velmi důležitá pro uchovávání ESM jehličnanů, a to jak z hlediska bezpečí kultury před kontaminací, zachování embryogenní kapacity, tak i z důvodů ekonomických, protože určitý kvalitativní znak (např. u transformovaných jedinců *Chamaecyparis obtusa* produkujících pylová zrna nezpůsobující těžké alergie (Maryuama et al., 2005)) se může projevit až po mnoha letech růstu, po kterou by musela být jinak ESM kultivována.

Sacharidy zastávají rovněž funkci osmoprotektantů a zhášečů volných radikálů (McKersie., 1996). Sacharidová ochrana je však jen jednou z vícero působících ochranných složek v průběhu desikace. V pozdních fázích zrání, kdy embryo začíná trpět nedostatkem vody, dochází k zásadním změnám v genové expresi. V embryu se začínají objevovat tzv. Late embyogenesis abundant proteins (LEA proteiny) (např. Hughes a Galau, 1991). Během desikace jejich zastoupení v buňce roste a postupně se stávají převládajícími proteiny. Přestože bylo navrženo mnoho ochranných funkcí, které by tyto proteiny mohly v buňce zastávat, jejich hlavní role zůstává stále neznámá (Goyal et al., 2005), nicméně jejich funkce v ochraně buněčných struktur během vodního deficitu je dnes již nesporná.

V současnosti existuje relativně malé množství informací o vlivu sacharidů na průběh somatické embryogeneze jehličnanů. Vzhledem k mnohým funkcím sacharidů a předpokládané interakci s hormonálním řízením bude ještě nutno vynaložit značné úsilí, aby bylo možno plně porozumět této problematice.

6. Seznam použité literatury

Attree S. M., Moore D., Sawhney V. K., Fowke L. C.: Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moensch) Voss) somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. – *Annals of Botany*, **68**: 519-525, 1991- citováno podle **Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.:** Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. – *Planta*, **187**: 395-404, 1992

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

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

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

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

Avonce N., Leyman B., Thevelein J., Iturriaga G.: Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. – *Biochemical Society Transaction*, **33**: 276-279, 2005

Bachman M., Matile P., Keller F.: Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. – *Plant Physiology*, **105**: 1335-1345, 1994

Bernal-Lugo I., Leopold A. .: Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. – *Seed Science Research*, **5**: 75-80, 1995

Black M., Corbineau F., Grzesik M., Guy P., Côme D.: Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. – *Journal of experimental Botany*, **47**: 161-169, 1996

Black M., Corbineau F., Gee H., Côme D.: Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. – *Plant Physiology*, **120**: 463-467, 1999

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

Borisjuk L., Walenta S., Weber H., Mueller-Klieser W., Wobus U.: High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. – *Physiologia Plantarum*, **104**: 211-224, 1998

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

Brenac P., Smith M. E., Obendorf R. L.: Raffinose accumulation in maize embryos in the absence of a fully functional *Vp1* gene product. – *Planta*, **203**: 222-228, 1997

Bush D. R.: Sugar transporters in plant biology. – *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 187-191, 1999

Caffrey M., Fonseca V., Leopold A. C.: Lipid- Sugar Interactions. – *Plant Physiology*, **86**: 754-758, 1988

Carrier D. J., Cunningham J. E., Taylor D. C., Dunstan D. I.: Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) somatic embryos. – *Plant Cell Reports*, **16**: 550-554, 1997

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

Cho J-I., Ryoo N., Ko S., Lee S-K., Lee J., Jung K-H., Lee Y-H., Bhoo S. H., Winderickx J., An G., Hahn T-R., Jeon J-S.: Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). – *Planta*, 1-14, 2006

Crowe J. H., Crowe L. M., Chapman D.: Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. – *Science*, **223**: 701-703, 1984- citováno podle **Caffrey M., Fonseca V., Leopold A. C.:** Lipid- Sugar Interactions. – *Plant Physiology*, **86**: 754-758, 1988

Dijkwel P. P., Kock P., Bezemer R., Weisbeek P., Smeekens S. C. M.: Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. – *Plant Physiology*, **110**: 455-463, 1996

Dijkwel P. P., Huijser C., Weisbeek P. J., Chua N-H., Smeekens S. C. M.: Sucrose control of phytochrom A signalling in *Arabidopsis*. – *Plant cell*, **9**: 583-595, 1997

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

Find J. I.: Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. – *Plant Science*, **128**: 75-83, 1997

Flinn B. S., Roberts D. R., Newton C. H., Cyr D. R., Webster F. B., Taylor I. E. P.: Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. – *Physiologia Plantarum*, **89**: 719-730, 1993

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

Golovina E. A., Hoekstra F. A., van Aelst A. C.: Programmed cell death or desiccation tolerance: Two possible routes for wheat endosperm cells. – *Seed Science Research*, **10**: 365-379, 2000

Gonzali S., Loreti E., Solfanelli C., Novi G., Alpi A., Perata P.: Identification of sugar-modulated genes and evidence for in vivo sugar sensing in *Arabidopsis*. – *Journal of Plant Research*, **119**: 115-123, 2006

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

Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A.: Lea proteins prevent prorein aggregation due to water stress. – *Biochemical Journal*, **388**: 151-157, 2005

Grigová M.: Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): studium dynamiky vybraných zásobních látek. – *Diplomová práce, PřFUK*, 2003

Gupta P. K., Grob J. A.: Somatic embryogenesis in conifers. V: Jain S., Gupta P., Newton R. (eds.): *Somatic embryogenesis in woody plants*. – *Kluwer Academic Publishers*, **1**: 81-98, 1995

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

Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T.: The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). – *Plant Science*, **38**: 53-59, 1985

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

Halford N. G., Purcell P. C., Hardie D.G.: Is hexokinase really a sugar sensor in plants? – Trends in Plant Science, **4**: 117-119, 1999

Hoekstra F. A., Golovina E. A., Tetteroo F. A. A., Wolkers W. F.: Induction of Desiccation Tolerance in Plant Somatic Embryos: How Exclusive is the Protective Role of Sugars. – Cryobiology, **43**: 140-150, 2001

Huber S. C., Huber J. L.: Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. – Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **47**: 41-444, 1996- citováno podle **Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhyl D.:** Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzymes activities. – Journal of Plant Physiology, **159**: 387-396, 2002

Hughes D. W., Galau G. A.: Developmental and environmental induction of *Lea* and *LaeA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. – The Plant Cell, **3**: 605-618, 1991

Iraqi D., Tremblay R.: The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo. – Physiologia Plantarum **111**: 381 – 388, 2001a

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

Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S., Tremblay F. N.: Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. – Journal of Plant Physiology, **162**: 115-124, 2005

Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J.: Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 3. Gymnosperms. Dordrecht.– Kluwer Academic Publishers, 1995 – citováno podle **Iraqi D., Tremblay F. M.:** Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. – Journal of Experimental Botany, **52**: 2301-2311, 2001a

Jang J-C., SheenJ.: Sugar sensing in higher plants. – The Plant Cell, **6**: 1665-1679, 1994

Jang J-C., SheenJ.: Sugar sensing in higher plants. – Trends in Plant Science, **2**: 169-174, 1997

Kermode A. R.: Regulatory mechanisms involved in the transition in the transition from seed development to germination. – CRC Crit Review in Plant Science, **9**: 155-195, 1990 – citováno podle **Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.:** Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmotikum, and their tolerance to drying and frozen storage. – Journal of Experimental Botany, **46**: 433-439, 1995

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

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

Koch K.E., Ying Z., Wu Y., Avigne W. T.: Multiple path of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. – Journal of Experimental Botany, **51**: 417-427, 2000

Koch K.: Sucrose metabolism: regulatory mechanism and pivotal roles in sugar sensing and plant development. – Current Opinion in Plant Biology, 2004

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

Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.: Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzymes activities. – Journal of Plant Physiology, **159**: 387-396, 2002

Konrádová H., Grigová M., Lipavská H.: Cold-induce accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). – In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, **39**: 425-427, 2003

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

Kruger N. J.: Carbohydrate synthesis and degradation . In: Dennis D. T., Turpin D. H. (eds). – Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman Scientific and Technical, Harlow, 59-76 – citováno podle **Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.:** Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzymes activities. – Journal of Plant Physiology, **159**: 387-396, 2002

Kumštýřová L., Vágner M., Lipavská H., Gösslová M.: Somatic embryogenesis of Norway spruce: anatomical characterization and content of non-structural saccharides. – Plant Physiology and Biochemistry, **38**: 43 (Suppl.), 2000

Lalonde S., Boles E., Hellman H., Barker L., Patrick J. W., Frommer W. F., Ward J. M.: The Dual Function of Sugar Carriers. – Transport and Sugar Sensing, The Plant Cell, **11**: 707-726, 1999

Lipavská H., Vreugdenhil D.: Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. – Plant Cell Tissue and Organ Culture, **45**: 103-107, 1996

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

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

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

Loreti E., Alpi A., Perata P.: Glukose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of α -amylase in barley embryos. – *Plant Physiology*, **123**: 939-948, 2000

Loreti E., De Bellis L., Alpi A., Perata P.: Why and how do plant cells sense sugars? – *Annals of Botany* **88**: 803-812, 2001

Maruyama E., Ishii K., Hosoi Y.: Efficient Plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. – *Journal of Forest Research*, **10**: 73-77, 2005

McKersie B.D., Stinson R. H.: Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. – *Plant Physiology*, **66**: 316-320, 1980

McKersie B. D.: Desiccation stress. – www.Cropsoil.psu.edu/Courses/Agro518/Desiccat.htm, 1996

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

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

Misra S., Green M. J.: Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. 1. Seed proteins and protein composition of mature embryo and the megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.) . – *Plant Science*, **68**: 163-173, 1990

Muzquiz M., Burbano C., Mercedes M. P., Folkman W., Gulewicz K.: Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides preparative method for their isolation and purification. – *Industrial Crops and Products*, **19**: 183-188, 1998

Németh K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kálmán Z., Stankovic-Stangeland B., Bakó L., Mathur J., Ökrész L., Stabel S., Geigenberger P., Stitt M., Rédei G.P., Shell J., Koncz C.: Pleiotropic control of glukose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. – *Genes and Development*, **12**: 3059-3073, 1998

Newton R. J., Puryear J. D., Bhaskaran S., Smith R. H.: Polyethylene glycol content of osmotically stressed callus cultures. – *Journal of Plant Physiology*, **135**: 646-652, 1990 – citováno podle **Tremblay L., Tremblay F. M.:** Maturation of black spruce somatic embryos:

Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**: 39-46; 1995

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

Obendorf R. L.: Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. – *Seed Science Research*, **7**: 63-74, 1997

Pond S. E., von Aderkas P., Bonga J. M.: Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation) . – *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, **38**: 334-341, 2002

Reuther G., Schuller A., Gajdosova A.: The role of carbohydrates in somatic embryogenesis of *Abies* ESM-cultures. In: *Recent Advances in Plant Biotechnology. Book of abstracts* (pp. 1-11). Institute of plant genetics SAS, Nitra, Slovak Republic, October 2-6, 1995- citováno podle **Schuller A., Kirschner-Neß R., Reuther G.:** Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **60**: 23-31, 2000

Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy J. M. S., Murray J. A. H.: Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. – *Molecular and Cellular Biology*, **20**: 4513-4521, 2000

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

Roberts D. R., Sutton C. S., Flinn B. S.: Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. – *Canadian Journal of Botany*, **68**: 1086-1090, 1990

Roitsch T., Bittner M., Godt D. E.: Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and glucose analogues and tissue specific expression suggest a role in sink source regulation. – *Plant Physiology*, **108**: 285-294, 1995

Roitsch T.: Source-sink regulation by sugars and stress. – *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 198-206, 1999

Roitsch T., Balibrea M. E., Hofmann M., Proels R., Sinha A. K.: Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. – *Journal of Experimental Botany*, **54**: 513-524, 2003

Rolland F., Brandon M., Sheen J.: Sugar sensing and signalling in plants. – *The Plant Cell*, S185-S205, 2002

Rolland F., Sheen J.: Sugar sensing and signalling networks in plants. – *Biochemical Society Transactions*, **33**: 269-271, 2005

Rook F., Bevan M. W.: Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. – *Journal of Experimental Botany*, **54**: 495-501, 2003

Salajová T., Salaj J., Kormuťák A.: Initiation of embryogenic tissue and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. – *Plant Science*, **145**: 33-40

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

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

Schuller A., Kirschner-Neß R., Reuther G.: Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **60**: 23-31, 2000

Scott P., Lyne R. L., ap Rees T.: Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) . – *Planta*, **197**: 435-441, 1995

Sinha A. K., Hofmann M. G., Römer U., Köckenberger W., Elling L., Roitsch T.: Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathway in tomato. – *Plant Physiology*, **128**: 1480-1489, 2002

Smeekens S.: Sugar-induced signal transduction in plants. – *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**: 49-81, 2000

Stasolla C., Kong L., Yeung E. C., Thorpe T. A.: Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. – *In Vitro Plant, Cellular and Developmental Biology - Plant*, **38**: 93-105, 2002

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

Steiner N., do Nascimento Vieira F., Maldonado S., Guerra M. P.: Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. – *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**: 895-903, 2005

Stone S. L., Gifford D. J.: Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. II. Storage triacylglycerols and carbohydrates. – *International Journal of Plant Science*, **160**: 663-671, 1999

Sturm A.: Molecular characterisation and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota*). – *Journal of experimental botany*, **47**: 1187-1192, 1996

Sturm A.: Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. – *Plant Physiology*, **121**: 1-7, 1999

Sturm A., Tang G-Q.: The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. – *Trends in Plant Science*, **4**: 401-407, 1999

Sun W. Q., Irving T. C., Leopold A. C.: The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. – *Physiologia Plantarum*, **90**: 621-628, 1994

Sung S-J. S., Xu D-P., Black C. C.: Identification of actively filling sucrose sinks. – *Plant Physiology*, **89**: 1117-112, 1989

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

Swedlund B., Locy R. D.: Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. – *Plant Physiology*, **103**: 1339-1346; 1993

Taber P., Zhang C., Wei-Shou Hu: Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. – *Canadian Journal of Botany*, **76**: 5, 863-871, 1998

Taniguchi T., Kurita M., Itahana N., Kondo T.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. Et Zucc.), *Plant Cell Reports*, **23**: 26-31, 2004

Tautorus T. E., Fowke L. C., Dunstan D. I.: Somatic embryogenesis in conifers. – *Canadian Journal of Botany*, **69**: 1873-1899, 1991

Tautorus T. E., Lulsdorf M. M., Kikcio S. I.: Nutrient utilization during bioreactor culture, and maturation of somatic embryo cultures of *Picea mariana* and *Picea-glauca-engelmanii*. – *In Vitro Cellular and Developmental Biology* – *Plant*, **1**: 58-63, 1994

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

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

Vooková B., Gajdošová A., Matúšová R.: Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies* and *alba Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids. – *Biologia Plantarum*, **40**: 523-530, 1998

Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L.: Developmental pathway of somatic embryogenesis. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **69**: 233-249, 2002

Von Arnold S., Hakman I.: Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). – *Journal of Plant Physiology*, **132**: 164-169, 1988

Von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U., Mo L. H.: Somatic embryogenesis in conifers- A case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. – *Plant Growth Regulation*, **20**: 3-9, 1996

- Vooková B., Gajdošová A., Matúšová R.:** Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids. – *Biologia Plantarum*, **40**: 523-530, 1998
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U.:** Sugar import and metabolism during seed development. – *Trends in Plant Science*, **2**: 169-174, 1997
- Winter H., Huber S. C.:** Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. – *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**: 31-67, 2000
- Williams R. J., Leopold A.C.:** The glassy state in corn embryos. – *Plant Physiology*, **89**: 977-981, 1989
- Wobus U., Weber H.:** Sugars as signal molecules in plant seed development. – *Biological Chemistry*, **390**: 937-944, 1999
- Yokoyama R., Hirose T., Fujii N., Evalour T., Aspuria T., Kato A., Uchimiya H.:** The rolC promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. – *Molecular Genetics and Genomics*, **244**: 15-22. 1994
- Zeng Y., Wu Y., Avigne W. T., Koch K. E.:** Rapid Repression of Maize Invertases by Low Oxygen. Invertase/Sucrose Synthase Balance, Sugar Signaling Potential, and Seedling Survival. – *Plant Physiology*, **121**: 599-608, 1999