

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin

**Studium vlivu fytohormonů a ektomykorhizních hub
při maturaci a konverzi somatických embryí jehličnanů**

Magisterská práce

2013/2015

Mariia Filippova

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem magisterskou práci na téma „Studium vlivu fytohormonů a ektomykorhizních hub při maturaci a konverzi somatických embryí jehličnanů“ zpracovala sama a uvedla jsem všechny použité prameny. Souhlasím, aby moje magisterská práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, uložena v knihovně Mendelovy univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům ve shodě s Vyhláškou rektora Mendelovy univerzity o archivaci elektronické podoby závěrečných prací. Autor kvalifikační práce se dále zavazuje, že před sepsáním licenční smlouvy o využití autorských práv díla s jinou osobou (subjektem) si vyžádá písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuje se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla dle řádné kalkulace.

V Brně, dne

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Mnohokrát děkuji paní Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. za přátelský přístup, pečlivost, cenné rady a odborné vedení během práce. Mé vřelé poděkování patří i ostatním členům našeho týmu: Martině Jůzové za vstřícnost, trpělivost a praktickou pomoc během celého experimentu, Ing. Biljaně Đorđević za věnovaný čas, pochopení a obětavost. Děkuji Ing. Miloslavě Kavkové, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity za spolupráci a odborné školení. Ráda bych také poděkovala svým nejbližším přátelům a rodině za redigování, neocenitelnou podporu a lásku.

ABSTRAKT

Tato práce pojednává o studiu vlivu různých fytohormonů, především kyseliny abscisové na chod maturace a auxinu i giberelinu na chod konverze dvou druhů jehličnanů, *Abies alba* a *Picea abies*, často používaných jako materiál při zkoumání somatické embryogeneze. Každý genotyp preferuje určitou koncentraci ABA. Pro buněčné linie *Abies alba* jsou nejúčinnější 15 μM a 45 μM , pro *Picea abies* – 15 μM a 30 μM ABA. Auxin (IBA) a giberelin (GA3) nepodpořily růst kořenů u *Abies alba*. Byla sledována také interakce mezi houbovými kulturami *Paxillus involutus* a *Amanita muscaria* a embryí během konverze. Houbová kultura *Paxillus involutus* měla velmi vysokou rychlost růstu na konverzním médiu. Houbová kultura *Amanita muscaria* rostla velmi pomalu. Efekt hub na konverzi nebyl prokázán.

Klíčová slova: somatická embryogeneze, *Picea abies*, *Abies alba*, fytohormony, kyselina abscisová, indolyl-3-máselná kyselina, kyselina giberelová, ektomykorhizní symbióza, *Paxillus involutus*, *Amanita muscaria*, zakořeňování, maturace, konverze.

ABSTRACT

This thesis deals with the exploration of the influence of various phytohormones, primarily the influence of abscisic acid on the process of maturation and the influence of auxin and gibberellin on the process of germination of two types of conifers, *Abies alba* and *Picea abies*, often used as a material in the discovery of somatic embryogenesis. Each genotype prefers specific concentration ABA. 15 μM and 45 μM is the most effective for the cell lines *Abies alba*; 15 μM and 30 μM ABA for *Picea abies*. Auxin (IBA) and gibberellin (GA3) did not support the growth of roots of *Abies alba*. The interaction between fungal cultures *Paxillus involutus* and *Amanita muscaria* and between the embryos during the germination was studied as well. Fungal culture *Paxillus involutus* had very fast speed of growth on the germination medium. Fungal culture *Amanita muscaria* was growing very slowly. The effect of fungi on the germination has not been observed.

Keywords: somatic embryogenesis, *Picea abies*, *Abies alba*, plant hormones, abscisic acid, indolyl-3-butyric acid, gibberellic acid, ectomycorrhizal symbiosis, *Paxillus involutus*, *Amanita muscaria*, rooting, maturation, germination.

OBSAH

POUŽITÉ ZKRATKY	8
1 ÚVOD	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Somatická embryogeneze dřevin	11
2.1.1 Úloha fytohormonů při somatické embryogenezi	11
2.1.2 Auxin	13
2.1.3 Cytokininy	14
2.1.4 Kyselina abscisová	16
2.1.5 Brassinosteroidy	18
2.1.6 Gibereliny	19
2.2 Ektomykorhizní symbióza	19
2.2.1 Příklady druhů ektomykorhizních hub používaných pro somatickou embryogenezi	22
2.2.2 Příklady působení ektomykorhizních hub na průběh embryogeneze dřevin	23
2.2.3 Anatomicko-fyziologický popis druhu muchomůrka červená (<i>Amanita muscaria</i> L. ex Fr. Hook.)	24
2.2.4 Anatomicko-fyziologický popis druhu čechratka podvinutá (<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.)	24
3 CÍLE PRÁCE	26
4 MATERIÁL A METODY	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Rostlinný materiál	27
4.1.2 Kultury hub	27
4.1.3 Kultivační média	28
4.2 Metody a příprava pokusu	31
4.2.1 Maturační média	31
4.2.2 Desikace	32
4.2.3 Konverzní média	33
4.3 Experimentální design a statistické zpracování výsledků	35
5 VÝSLEDKY	36
5.1 Vliv kyseliny abscisové na maturaci	36

5.2 Desikace	38
5.3 Vliv kyseliny abscisové na následnou konverzi (GM 1 bez fytohormonů)	40
5.4 Vliv auxinu na konverzi (GM 2)	42
5.5 Vliv kyseliny giberelové na konverzi (GM 3)	44
5.6 Vliv ektomykorhizních hub na konverzi (GM 4)	46
6 DISKUZE	48
7 ZÁVĚR	51
8 CONCLUSION	52
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

POUŽITÉ ZKRATKY

2,4-D – kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

2iP – 2-isopentenyladenin

ABA – kyselina abscisová

AM – *Amanita muscaria*

BA – benzyladenin

CK – cytokininy

cZ – *cis*-zeatin

DZ – dihydrozeatin

ECM – ektomykorhiza, ektomykorhizní

ESM – embryonální a suspensorová masa

GA3 – kyselina giberelová

GM – germinační médium

IAA – indolyl-3-octová kyselina

IBA – indolyl-3-másečná kyselina

iPA – isopentenyladenin

MS – Murashige-Skoog

NAA - α -naftylactová kyselina

PCIB – p-chlorofenoxymásečná kyselina

PEG-4000 – polyethylene glycol 4000

PEM – proembryonální masa

PI – *Paxillus involutus*

PTA – polární transport auxinu

RR – růstové regulátory

SE – somatická embryogeneze

TDZ – thidiazuron

TIBA – 2,3,5-trijodbenzoová kyselina

tZ – *trans*-zeatin

1 ÚVOD

Somatická embryogeneze dřevin je v mnoha zemích považována za účinný doplněk pro zlepšení kvality lesa a lesního materiálu, u nás zatím v praxi rozšířená není. Je metodou, která v budoucnosti umožní rychlou a nízkonákladovou produkci množství semenáčků s určitými vlastnostmi. Z přibližně 115-120 známých druhů borovic je téměř jedna pětina vhodná ke klonování přes somatickou embryogenezi (SE). Pomocí somatické embryogeneze je možné produkovat velké množství embryí, které mají stejné fyziologické a morfologické charakteristiky, což ji činí velmi užitečným nástrojem při různých pracích zaměřených na rostlinnou fyziologii nebo na šlechtění. Používá se také jako jedna z klíčových metod v genovém inženýrství (Aderkas a kol., 2001). Určitý potenciál má i z komerčního hlediska, neboť existují různé patenty, které jsou na této technologii založené nebo s ní propojené (Muralidharan, Kallarackal, 2005).

V minulosti byla somatická embryogeneze jehličnanů, zejména některých druhů smrku, široce využívána jako modelový systém pro studium mnoha aspektů embryogenního procesu embryogeneze jako celku. V současnosti je většina průzkumů v této oblasti zaměřena na zkoušení a navrhování vhodných složení médií zabezpečujících produkci správně vyvinutých konvertovaných embryí, která jsou schopna pokračovat v růstu i po přenesení do *ex vitro* podmínek (Stasolla a kol., 2002). Toto vyhledávání už trvá skoro šedesát let, do některých protokolů byly přidány takové složky jako thidiazuron (TDZ) nebo ancymidol, které se prokázaly být účinné i pro dřeviny. Avšak zatím jsou vzácností protokoly efektivní jak svou účinností, tak i univerzálností. Je to tím, že faktory ovlivňující maturaci dřevin stále nejsou dokonale pochopeny, a proto jsou velkou překážkou k mikropropagaci významných druhů (Muralidharan, Kallarackal, 2005). Stanovit správné složení média, které by bylo účinné pro široké spektrum genotypů určitého druhu dřeviny, je značně důležité, protože by mnohonásobně zvýšilo komerční atraktivitu metody SE (Pullman, 2003).

Při vyhledávání nejvhodnějšího protokolu se ověřují různá složení médií nebo se mění délka jednotlivých stádií embryogeneze. V některých protokolech se mezi proliferací a maturací vynechává krok kultivace embryonální a suspenzorové masy (ESM) 1-2 týdny na médiu neobsahujícím žádné růstové regulátory. Tato práce je zaměřena na výzkum koncentrace jednotlivých fytohormonů v průběhu maturace a konverze u smrku *Picea abies* (L.) H. Karst a jedle *Abies alba* Mill. s cílem určit nejvhodnější koncentraci pro každý druh, popřípadě každou

buněčnou linii, dále na zjištění, zda fytohormony mohou zlepšit schopnost buněčných linií vytvářet somatická embrya a vypracování protokolu a získání plnohodnotných somatických konvertovaných embryí působením fytohormonů bez přidání osmoticky aktivních látek jako např. PEG-4000.

Jako pokus při konverzi spolu s fytohormony byly využity ektomykorhizní houby pro srovnání jejich působení, jelikož kvůli mykorhizní symbióze se řadě autorů podařilo zlepšit kvalitu odvozených konvertovaných embryí a jejich odolnost.

Smrk byl v rámci práce vybrán jako modelová dřevina, protože vykazuje velkou flexibilitu ve vztahu k mnoha rozdílným postupům somatické embryogeneze (Klimaszewska a Cyr, 2002).

Oproti tomu jedle v podmínkách *in vitro* regeneruje značně komplikovaně. Hlavními důvody jsou relativně nízká iniciační frekvence a nízká nebo žádná maturační frekvence somatických embryí (Krajňáková a kol., 2008).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Somatická embryogeneze dřevin

Somatická embryogeneze je proces vyvinutí embrya ze somatických (nikoliv generativních) buněk. U jehličnanů byla poprvé popsána asi před čtyřiceti lety. U *Picea abies* somatická embrya, schopna vytvářet životaschopné konvertované rostliny, byla získána v roce 1985 (Čermáková, 2012), u *Abies alba* – v roce 1996 (Salajova a kol., 1996). V současnosti je možné pomocí SE účinné množit víc než 40 druhů čeledi borovicovité (Stasolla, Kong, 2002).

SE dřevin lze rozdělit do pěti základních stádií:

1. Indukce – odvození embryogenního pletiva z primárního explantátu na indukčním médiu. U jehličnanů se používají například nezralá zygotická embrya. Indukční médium obsahuje cukry, minerální živiny, auxin (tř., 2,4-D) a cytokininy (tř., NAA nebo BA). Výsledkem tohoto stádia je získání embryogenního pletiva.

2. Proliferace – udržování růstu embryogenních buněk. Používá se v podstatě stejné médium jako pro předchozí stádium, liší se od něj nižší koncentrací auxinu a cytokininu.

3. Maturace – stádium zrání somatického embrya, během kterého embryo mění svoji strukturu, roste a hromadí zásobní látky. Maturační médium místo auxinu a cytokininu obsahuje ABA, jejíž hlavní rolí je zabránění předčasné zralosti embryí a kumulace dostatečné zásoby proteinů. Na konci maturace embryo dosahuje stádia zralého kotyledonárního embrya.

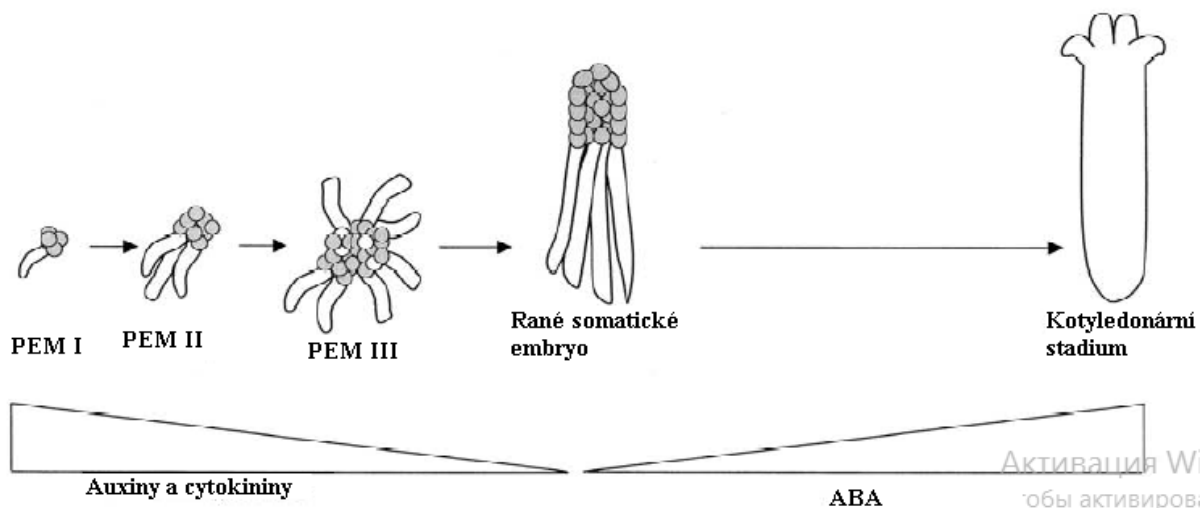
4. Desikace – postupné vysoušení embrya, kdy ztráta vody vede k zpomalení fyziologických procesů v buňkách. Zároveň se snižuje hladina ABA.

5. Konverze – proces vzniku rostliny, který odpovídá klíčení zygotického embrya. Embryo se přenaší po desikaci na germinační médium, většinou neobsahující růstové regulátory. Růst embrya začíná nejčastěji prodlužováním kořene, hypokotylu a konečně růstem kotyledonů a tvorbou nových jehlic (Stasolla, Yeung, 2003; Čermáková, 2012).

2.1.1 Úloha fytohormonů při somatické embryogenezi

Účinnost SE velmi závisí na počátečních podmínkách: typu explantátů, vývojové fázi embrya, složení média (Pullman, 2011). Je zřejmé, že bez určitých kultivačních podmínek není

SE schopna probíhat správným směrem. Obvykle tyto podmínky tvoří obsah média (přítomnost a množství fytohormonů, cukrů, minerálních živin, osmotika), světelný režim, teplota, množství vodní páry a také vlastnosti samotných explantátových kultur (Procházka a kol., 1997). Přes signální molekuly (butenolid, kyselina salicylová, ionty vápníku, aminokyseliny, antioxidanty) prostředí ovlivňuje směr vývoje embryogenních meristémů (Teixeira da Silva a kol., 2012).

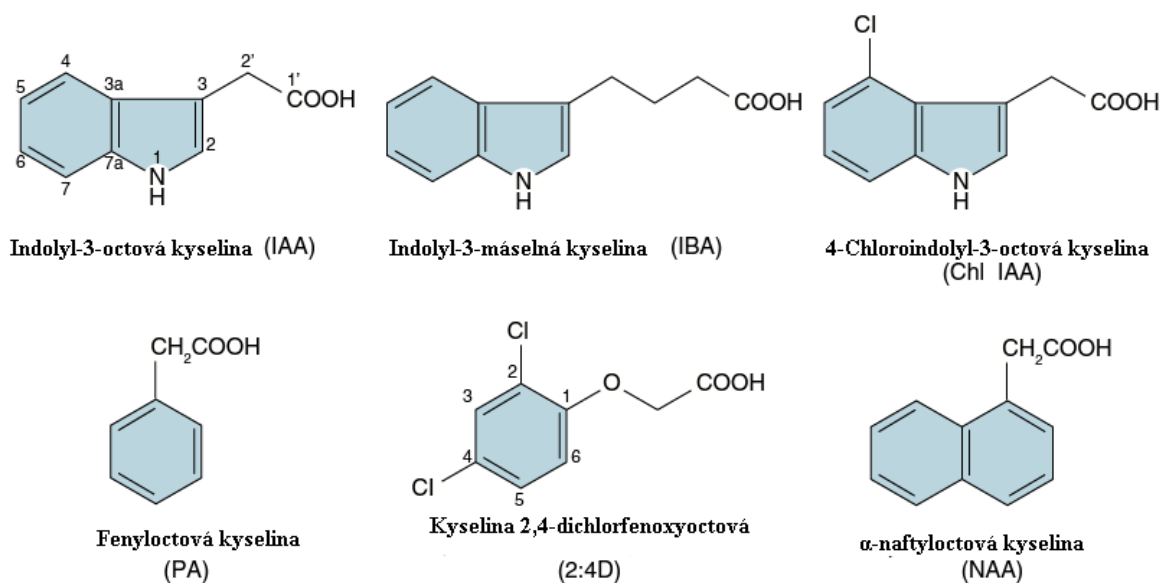


Obrázek č. 1 – Diagram poměru fytohormonů auxinu, cytokininu (CK) a kyseliny abscisové (ABA) během stádií SE u *Picea abies* (Stasolla, 2003).

Fytohormony je třeba rozdělit na endogenní (v embryích) a exogenní (obsažené v médiu). Ačkoli během několika desetiletí byl kladen důraz na zdokonalení maturačních a germinačních podmínek, které by umožňovaly získávat plně vyvinutý semenáček, v nedávných letech byla na pokusech se smrkem prokázána závislost produktivity ESM na počátečních koncentracích fytohormonů (Stasolla, 2003).

2.1.2 Auxin

Ze všech fytohormonů používaných při pokusech s explantátovými kulturami byl auxin jedním z prvních, jehož vliv na vývoj těchto kultur byl důkladně prozkoumán. Rostlinné buňky *in vitro* kulturách jsou schopny produkovat endogenní auxin ve formě indolyl-3-octové kyseliny (IAA) (Teixeira da Silva a kol., 2012). Předpokládá se, že polární transport auxinu (PTA) je centrálním induktorem rostlinné embryogeneze. Ve zralých embryích většiny krytosemenných a nahosemenných rostlin se tento transport uskutečňuje směrem ke kořenu nezávisle na orientaci embrya (Cooke a kol., 1993; Hamann, 2001). PTA má značný význam pro vytváření oboustranné symetrie během rané embryogeneze rostlin (Liu a kol., 1993). Indukuje tvorbu apikálního a kořenového meristému embrya (Berleth a Sachs, 2001; Larsson a kol., 2008).



Obrázek č. 2 - Struktury přirozeně se vyskytujících auxinů (IAA, IBA, ChlIAA a PA) a dvou syntetických auxinů (2,4-D a NAA), široce používaných jako herbicid a jako induktor tvorby kořenů u řízků (podle Jonese, 2013).

Auxin je zpravidla povinnou složkou indukčního a proliferačního média (Stasolla a kol., 2002). Většinou se používají jeho nativní (IAA, IBA) nebo syntetické (NAA, 2,4-D, kyselina 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová) formy (Bhojwani, Dantu, 2013). Přestože je IAA přirozeným hormonem, je její použití ve výzkumných pracích velmi náročné kvůli její nestálosti, snadné

dekarboxylaci a citlivosti k UV záření, které vyvolává její rozklad (Procházka, 1997). Její zásobní roztoky mají proto trvanlivost jeden týden v chladu. Na rozdíl od ní jsou NAA i 2,4-D stabilnější a vydrží i 8 měsíců (Hradilík, 2005).

Proliferace ESM může probíhat i na médiu bez přídavku exogenního auxinu jen v přítomnosti cukrů (3% sacharózy), jak to bylo prokázáno u *Abies alba*. Avšak kvalita a struktura odvozené ESM se bude lišit ve prospěch média s auxinem. Raná somatická embrya vypěstovaná na médiu s auxinem na začátku maturace mají větší obsah endogenního hormonu než embrya na médiu bez auxinové složky (25 ng/g proti 2,5 ng/g). Následující snížení úrovně endogenního auxinu v somatických embryích během stádia maturace na základním médiu (1/2 MS, 20 μM ABA, 4% maltóza, 3,75% PEG-4000, 0,4% gelrit) působí pozitivně na jejich vývoj, popřípadě to může být povinná část pro vytváření zralých životaschopných embryí a následně konvertovaných embryí (u *Abies alba*). Zároveň bylo zjištěno, že přesazení ESM na základní médium s 0,25 μM 2,4-D nebo inhibitorem p-chlorofenoxyisomáselnou kyselinou (PCIB) v rozmezí 2-20 μM vede k zániku embryí (Vondráková a kol., 2011).

Přítomnost auxinu ve formě indolyl-3-máselné kyseliny (IBA) s koncentrací 1 μM v maturačním médiu spolu s 60 μM ABA a 3 % PEG zlepšuje vývoj embryí u *Abies alba* (Szczygiel, Kowalczyk, 2001).

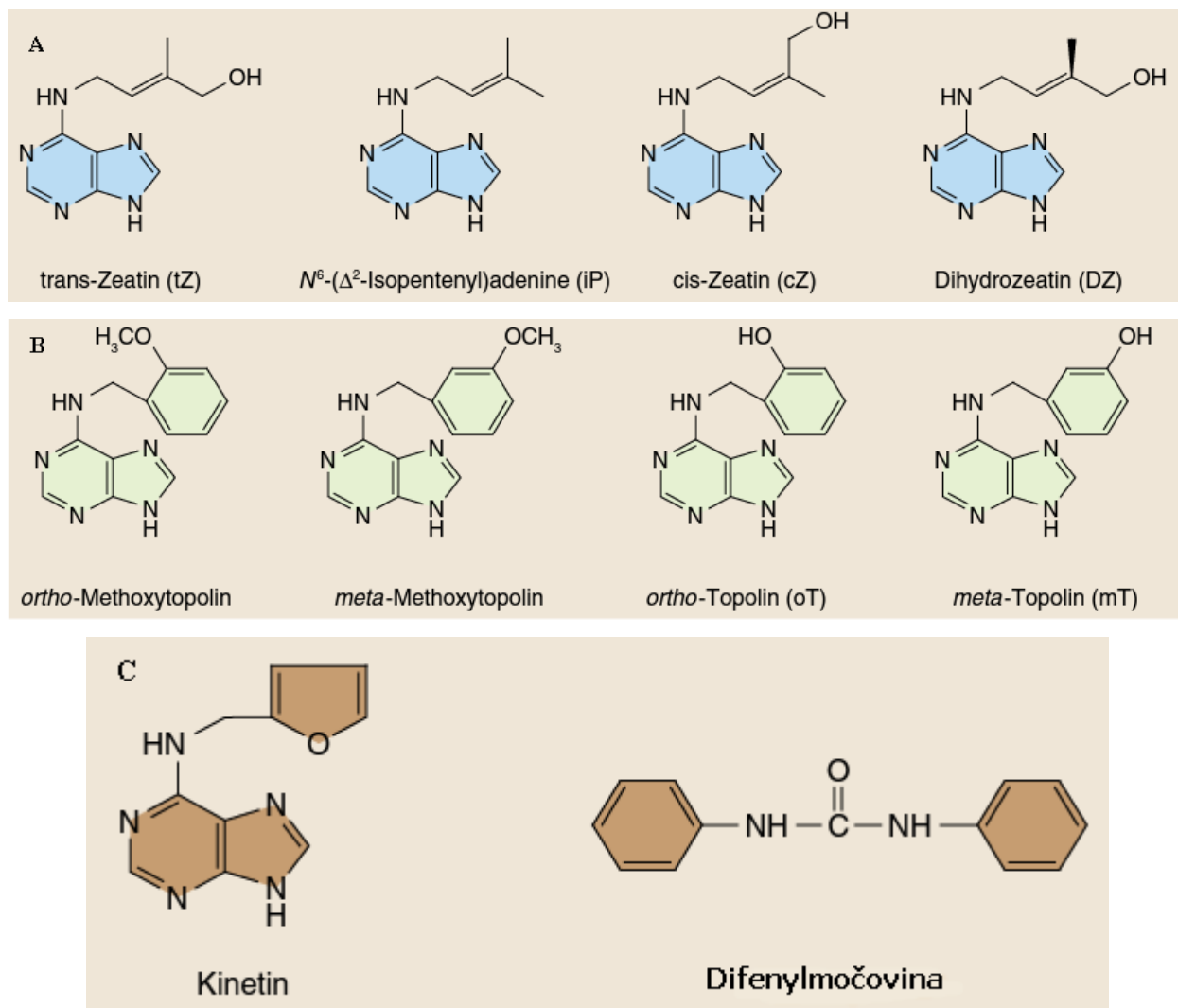
Co se týká germinace, auxiny mohou být přidány do média ve formě například IBA s koncentrací 0,1 μM pro rhizogenezi u *Abies numidica*. V kombinaci s 10 g/l aktivního uhlíku a 10 g/l sacharózy indukují tvorbu kořenů u 95 % embryí (Vooková, Kormuťák, 2001).

2.1.3 Cytokininy

Cytokininy, buď přirozené anebo syntetické s výjimkou N,N'-difenylmočoviny, jsou deriváty adeninu substituovaného na exocyklické aminoskupině v poloze N-6. U syntetických N,N'-difenylmočoviny a TDZ není zatím prokázáno, že rostliny jsou schopny je syntetizovat (Mok, 2001). Přirozené CK, ke kterým patří například izopentenyladenin (iPA), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ), benzyladenin (BA) a dihydrozeatin (DZ), lze rozdělit do dvou skupin podle typu substituenta v poloze N-6:

1. Izoprenoidní – CK s izopentenylovým postranním řetězcem v této poloze (zpravidla jsou to nejrozšířenější látky jako iPA, tZ, cZ, DZ)
2. Aromatické – CK s aromatickou skupinou v této poloze (BA a jeho deriváty).

Izoprenoidní CK mají různou aktivitu a citlivost k degradačnímu enzymu cytokininoxidázy. DZ a cZ jsou odolnější vůči působení tohoto enzymu, avšak jsou méně aktivní než iPA a tZ. Ve srovnání s izoprenoidními jsou aromatické CK méně rozšířené a prozkoumané (Jones, 2013; Procházka, 1997).



Obrázek č. 3 – Vzorce některých CK: A – izoprenoidní CK, B – aromatické CK, C – syntetické CK (podle Jonese, 2013).

Při indukci somatické embryogeneze bývají cytokininy obvykle pouze doplňující složkou média. Více se používají při kultivaci vyvíjejících se somatických embryí. Avšak u některých druhů rodu *Abies* byly indukce a proliferace ESM vyvolány samotnými cytokininy. Například při pokusech s *Abies balsamea* byly úspěšně používány jako složky indukčního a proliferačního média 10 μ M 2-isopentenyladenin (2iP), BA nebo TDZ. Druhou variantou byl 4,5 μ M BA plus

10 μM α -naftyloctové kyseliny (NAA). Po germinaci byla získána životaschopná konvertovaná embrya jedle (Guevin, 1994).

U *Abies nordmanniana* indukce a proliferace také probíhají na médiu pouze s cytokininem, 5 μM BA. Přidání auxinu zpomalovalo rychlost obou fází. Opačně působilo přidání L-glutaminu a/nebo hydrolyzátu kaseinu. Zajímavé je, že jiné změny, třeba zvětšení koncentrace BA nebo obsahu dusíku atd. neměly žádný kladný vliv na rychlost maturace (Viktor Nørgaard, Krogstrup, 1991).

Pokud nějaké buněčné linie nevytváří kotyledonární embrya na médiu s ABA, může je k tomu podnítit přidání 0,4 μM BA, jak to bylo prokázáno u *Abies alba*. Po 35 dnech maturace embrya na médiu pouze s 3,8 μM ABA bylo dosaženo stádia prekotyledonárních embryí, kdežto na médiu s ABA a BA bylo možné pozorovat už zralá kotyledonární embrya. Zeatin nebo 2iP nevykazovaly stejný vliv jako BA (Schuller a kol., 2000)

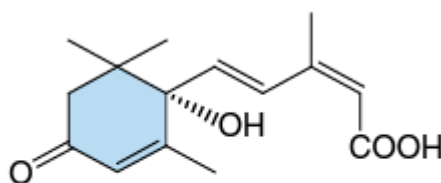
Smrk vyžaduje pro indukci a proliferaci spolupůsobení auxinu a cytokininu. Auxin indukuje diferenciaci somatických embryí, kdežto cytokininy jsou zodpovědné za normální morfologii embrya. Existují práce, podle kterých cytokinin jako jediný růstový regulátor proliferačního média působil vývoj větších embryogenních zón v kalusu, ale jedná se spíše o výjimku. Jako složky indukčního a proliferačního média se běžně používají BA, zeatin a kinetin. Co se týká TDZ nebo 2iP, výsledek jejich působení na buněčné kultury smrku je hodně závislý na genotypu buněčné linie. Tak 2iP inhiboval proliferaci PEM a rychlost maturace embryí u genotypů BLG-10 a 164-4, kdežto spolu s 40 μM ABA stimuloval maturaci u genotypu 186-5. TDZ v koncentraci $> 0.5 \mu\text{M}$ úplně zastavil maturaci u genotypu 186-5 (Latkowska a kol., 2001).

2.1.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je tetraterpen, jehož syntéza začíná v plastidech z meziproductů izoprenoidní dráhy a končí v cytosolu. Některé kroky biosyntézy jsou obdobné jako biosyntéza karotenoidů. Dokonce pigment β -karoten patří k meziproductům biosyntetické dráhy ABA. K funkcím ABA v rostlině patří například inhibice dělení buněk, regulace funkce průduchů, regulace dormance semen a pupenů, a také má svůj podíl při stárnutí a apoptóze (Jones, 2013).

Jedná se o nejběžněji používaný hormon při manipulaci s rostlinnými pletivy, třeba v experimentální morfologii, je užitečný pro nejrůznější techniky, ke kterým patří také somatická

embryogeneze. Má podstatnou úlohu během počátečního období fáze maturace semena, používá se také při vyvolání této fáze u somatických embryí u jehličnanů rodů *Picea*, *Larix* a *Pinus* (Šebánek, 2004). ABA během maturace zastavuje dělení embryí štěpením (proliferaci), stimuluje akumulaci zásobních látek a brání předčasnému klíčení (Salaj, 2003). Před aplikací ABA je nutný určitý stupeň morfologického vývoje raných embryí, protože maturace není prostřednictvím ABA indukovaná, pokud je embryonální hlava raných vláskovitých embryí příliš malá (Stasolla a kol., 2002).



**Kyselina abscisová (C₁₅)
(ABA)**

Obrázek č. 4 – vzorec ABA (podle Jonese, 2013).

ABA se dá úspěšně použít při maturaci a germinaci ESM *Abies alba* po dlouhodobé kryopreservaci, přičemž jako vhodnější pro formování somatických embryí se prokázala být nižší koncentrace 32 μM ABA než koncentrace 64 μM ABA (Krajňáková a kol., 2013).

V kombinaci s laktózou a sacharózou nízká koncentrace ABA (0-5 μM) zvyšuje během maturace podíl kotyledonárních embryí u *Abies alba*, zatímco na médiích s 20-40 μM ABA se tvořila pouze prekotyledonární embrya (Schuller a kol., 2000).

Hybrid *Abies cilicica* \times *Abies cephalonica* při porovnání MS maturačních médií s 10 nebo 20 μM ABA lépe reaguje na nižší koncentraci – somatická embrya dosahují kotyledonárního stádia (Korecký, Vítámvás, 2011).

Na rozdíl od rodu *Abies* mnohé druhy borovice vyžadují větší koncentrace ABA, aby maturace proběhla účinně. Tak ze 24 buněčných linií *Pinus radiata* 12 tvořilo 50-150 zralých embryí na 100 g čerstvé hmoty ESM při koncentraci 60 μM ABA, což jsou lepší výsledky než při zkoušení média s 90 μM ABA. Důležitějším z pohledu autorů je obsah cukru a dusíku než samotná koncentrace ABA (Montalbán a kol., 2010).

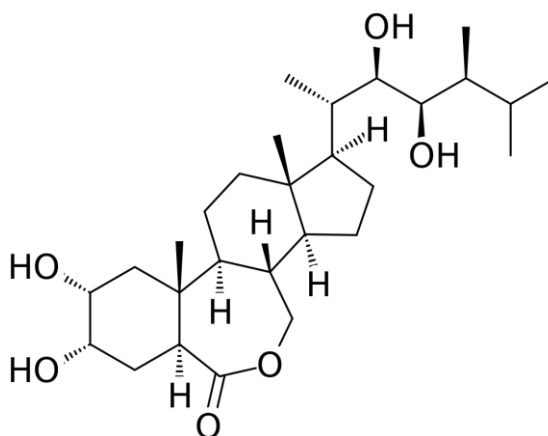
Co se týká smrku *Picea abies*, maturace probíhá o 50% lépe na médiu obsahujícím kombinaci ABA a PEG-4000 (např. 40 μM ABA + 5% PEG-4000 nebo 15 μM ABA + 5% PEG-4000), než na médiu s 40 μM ABA. Ale během germinace embrya získaná na médiu bez PEG-

4000 vykazují několikrát vyšší schopnost klíčení než ostatní. PEG-4000 snižuje takřka 2,5krát obsah endogenní ABA v embryích během maturace (Find, 1997).

Vzhledem k tomu, že v rostlinných pletivech hladina ABA klesá pomalu, je potřeba dostatek času, aby její účinek byl vyrovnán a nahrazen jinými rostlinnými hormony. Funguje tedy zpoždění fyziologické odpovědi, které poskytuje určitou ochranu před předčasným růstem buněk (Gana, 2010).

2.1.5 Brassinosteroidy

Na rozdíl od ostatních hormonů je informací o brassinosteroidech zatím k dispozici poměrně málo. Jedná se o relativně nedávno objevenou skupinu fytohormonálních látek, vyskytujících se u mnoha rostlinných druhů. Brassinosteroidy mají široké spektrum biologické aktivity, včetně stimulace elongace buněk a produkce etylenu, zesilují odolnost vůči abiotickým stresům (Pullman, 2003).



Obrázek č. 5 – Strukturovaný vzorec brassinolidu (upraveno podle Clouse, 1998).

V SE se brassinosteroidy používají zpravidla ve formě brassinolidu a jiných analogů. Brassinolid je v současnosti nejvíce bioaktivní formou brassinosteroidů. Embryogenní pletiva získaná z jehličnanů mohou být indukována na médiích s 24-epibrassinolidem (24-epiBR). V některých případech jsou účinnější než IAA nebo NAA. U *Pseudotsuga menziesii* zvyšují hmotnost embryogenního kalusu a stimulují indukci jeho tvorby (Teixeira da Silva a kol., 2012).

Brassinolid o koncentraci 0,1 μM stimuluje indukci kalusu u druhů *Pinus taeda*, *Picea abies* a *Pseudotsuga menziesii* o 15-20%. Výrazně zvyšuje hmotnost embryogenního kalusu u *Pinus taeda* (o 66%) a dokonce je schopen stimulovat tvorbu kalusu u těch genotypů

Pseudotsuga menziesii a *Pinus taeda*, které nevykazují žádnou reakci na médiích bez brassinolidu. Je zajímavé, že u *Pinus taeda* mohou být menší koncentrace (0,005 μM) v některých případech účinnější než větší (0,01 μM). Co se týká interakce brassinolidu s auxinem a CK, existuje domněnka, že výsledek (zda budou inhibovat anebo podporovat účinek brassinolidu) je závislý na jeho koncentraci (Pullman, 2003).

2.1.6 Gibereliny

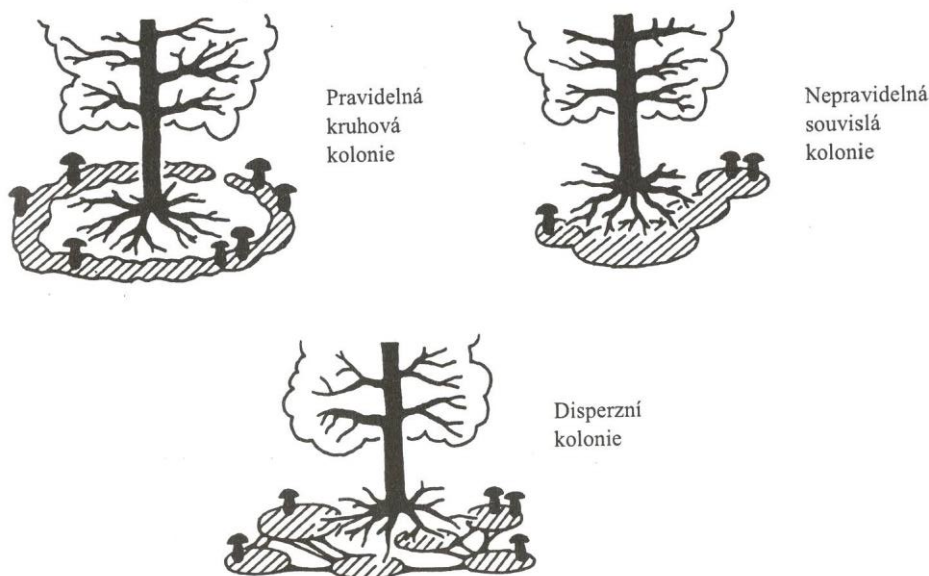
Gibereliny jsou látky přírodního původu, které jsou produkovány rostlinami i houbami. Jsou to tetracyklické diterpeny s 19 nebo 20 atomy uhlíku. Mají popisné číslo v názvu podle pořadí objevení. Většina z giberelinů patří k meziproductům biosyntetické dráhy (z nejrozšířenějších: GA1 a GA4), anebo jsou produkty jejich rozkladu. V rostlinných pletivech se vyskytují ve velmi stopových množstvích, zpravidla méně než 1 ng / 1 g čerstvé hmoty, což zřejmě komplikuje zkoumání jejich biosyntézy. Rostliny syntetizují gibereliny z izopentenylidifosfátu, který lze najít v chloroplastech. Stojí za zmínku, že biosyntetická dráha giberelinů na časných stádiích je biochemicky obdobná s biosyntetickou dráhou ABA, cytokininů a brassinosteroidů (Jones, 2013).

Účinek giberelinů je značně závislý na době a délce aplikace. Během maturace vede aplikace 10 μM kyseliny giberelové (GA3) v době prvních týdnů k poklesu rychlosti formování embryí (1,7 embryí / 1g čerstvé hmotnosti). Pokud je ale GA3 přidán v posledních 6 týdnech maturace, význačně zvyšuje počet zralých embryí u *Abies alba*, a to až na 44,5 zralých embryí na 1g čerstvé hmotnosti embryogenní buněčné hmoty (Krajňáková a kol., 2013).

2.2 Ektomykorhizní symbióza

Ektomykorhizní (ECM) symbióza je nejpopulárnějším typem symbiózy. Je často studována a nepřímo je zajímavá také pro laickou veřejnost, neboť plodnice ECM hub jsou často velmi vyhledávanou pochoutkou (Gryndler a kol., 2004). Když jsou v půdním prostředí vhodné podmínky a existují nutní hostitelé, ECM houba je schopná vytvořit půdní myceliální kolonii. Ta může mít 3 tvary podle Ogawy (Caroll, 1992):

1. Pravidelná kruhovitá kolonie (čarodějny kruh) – kolonie má formu kruhu, v centru se nachází hostitelský strom
2. Nepravidelná souvislá kolonie – hostitelský strom leží v centru nebo vedle kolonie, ale mezi nimi může být vzdálenost několika metrů.
3. Disperzní kolonie – tvoří se z mnoha částí vzájemně propojených myceliálními provazci.



Obrázek č. 6 – Typy půdních kolonií ECM hub.

Při kontaktu s kořenem mycelium nejprve začíná zabalovat krátké postranní kořínky. Tato kompaktní hyfová síť kolem kořenu má název hyfový plášť. Pak houba začíná produkovat do kořenů IAA jako signál o své přítomnosti, který působí změnu chování rostliny (zejména charakter růstu), a kořen „dovoluje“ houbě tvorbu polysacharidových fibril umožňujících adhezi hyf na povrch kořene. Houbová IAA indukuje tvorbu nových postranních kořínků, což znamená zvýšení množství tryptofanu v kořenových exudátech, který nakonec vyvolává zvýšení hladiny houbové IAA. Tyto změny jsou nutné proto, aby vznikla mykorhiza. V přítomnosti 2,3,5-trijodbenzoové kyseliny (TIBA) jako inhibitora transportu auxinu nebyl vznik ektomykorhizy pozorován. Předpokládá se, že vznik ektomykorhizy je v počátečních fázích řízen zejména koncentrací auxinu – jak bylo uvedeno výše, změnou jeho koncentrace v kořenových pletivech. Předpokládá se, že i cytokininy mohou hrát v tomto procesu určitou roli, protože rostliny s mykorhizou obsahují větší hladinu CK ve srovnání s nemykorhizními rostlinami. Mnohé houby

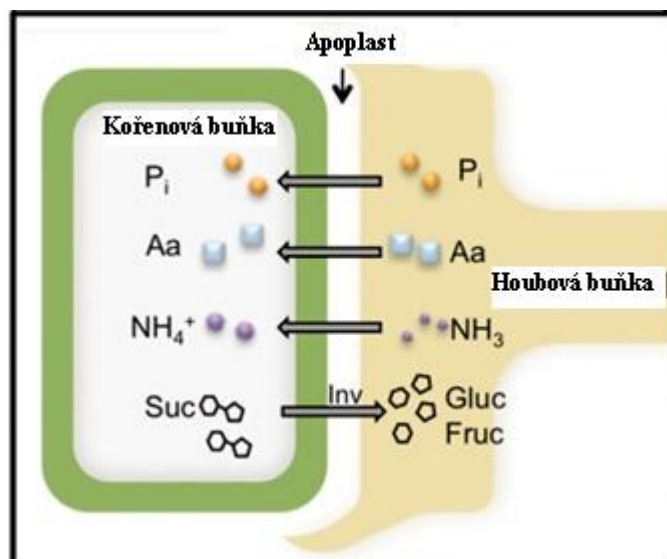
jsou schopné samostatně produkovat CK. Ale tento dohad, zda se CK skutečně podílí na vývoji ECM symbiózy, zatím není prokázán (Gryndler a kol., 2004; Rai a Varma, 2010).



Obrázek č. 7 – Ektomykorhiza na kořenech jehličnanů vytvořená houbami *Amanita muscaria* L. ex Fr. Hook (A) a *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (B).

Pro ektomykorhizu je také charakteristická Hartigova síť – hyfy prorůstající mezibuněčné prostory kořenového pletiva. Prostřednictvím nich se uskutečňuje komunikace mezi půdou, hyfovým pláštěm a kořenem. Houba proniká do vnějších vrstev primární kůry, pomocí enzymů rozpouští střední lamelu mezi buňkami a odsunuje je od sebe (Gryndler a kol., 2004).

Symbióza s ektomykorhizními houbami je pro rostliny velmi užitečná, obzvláště když jsou v půdě některé prvky v nedostatečném množství. Ektomykorhiza je schopna zlepšovat pohlcování prvků z půdy, například fosforu, dusíku, draslíku, vápníku a hořčíku. ECM houby aktivně rozkládají horninu a pomocí hyf transportují minerály do rostliny. Zvýšená koncentrace živin pozitivně působí na růst rostliny (zvětšuje se biomasa). Houby mohou ochraňovat hostitele před absorpcí těžkých kovů připojením na buněčnou stěnu nebo na extracelulární polysacharidy (Rai a Varma, 2010). Produkují různé extracelulární enzymy a střeží hostitele před fytopatogenními houbami (Azcón-Aguilar, 2009).



Obrázek č. 8 – Model přenosu živin. Houba dodává do kořenové buňky anorganické prvky, např. fosfor (P), aminokyseliny (Aa), amoniak (NH_3). Buňka vylučuje sacharózu (Suc), kterou v apoplastu invertáza (Inv) štěpí na glukózu (Glu) a fruktózu (Fruc). Houba je transportuje do rostoucího mycelia (podle Southwortha, 2012).

2.2.1 Příklady druhů ektomykorhizních hub používaných pro somatickou embryogenezi

Druh	Práce
<i>Amanita murina</i>	Sudhakara Reddy, Satyanarayana, 1998
<i>Laccaria bicolor</i>	Karabaghli-Degron a kol., 1998; Niemi a kol., 1998; Krajňáková a kol., 2012
<i>Laccaria laccata</i>	Sudhakara Reddy, Satyanarayana, 1998; Krajňáková a kol., 2012
<i>L. proxima</i>	Niemi a kol., 1998
<i>Paxillus involutus</i>	Niemi a kol., 1998; Sudhakara Reddy, Satyanarayana, 1998; Niemi a kol., 2002
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Niemi a kol., 1998; Sudhakara Reddy, Satyanarayana, 1998; Niemi a kol., 2007; Li-Hua Zhu a kol., 2010; Díez a kol., 2000; Krajňáková a kol., 2012
<i>Scleroderma polyrhizum</i>	Díez a kol., 2000
<i>Suillus variegatus</i>	Niemi a kol., 1998

2.2.2 Příklady působení ektomykorhizních hub na průběh embryogeneze dřevin

Kultura *Paxillus involutus* (PI) *in vitro* produkuje polyaminy (zejména spermidin a diamin putrescin) a IAA stimulující zakládání a růst kořenu semenáčků *Pinus sylvestris in vitro*. Tento účinek lze dosáhnout i bez vytváření ektomykorhizy (Niemi a kol., 2002).

Inokulace *Pisolithus tinctorius* během maturace a germinace somatických embryí *Pinus sylvestris* zvyšuje procento dozrání a formování embryí a v podmínkách *ex vitro* také zesiluje jejich odolnost (Niemi a kol., 2002). V kombinaci s exogenním spermidinem je možné dospět k ještě většímu počtu zralých somatických embryí (Niemi a kol., 2007).

V různých fázích vývoje ESM se účinek ECM hub mění – u *Abies cephalonica* Loud. kultury *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* inhibují proliferaci, ale stimulují zrání embryí během maturace (Krajňáková a kol., 2012).

Některé ECM houby v podmínkách *in vitro* nejen indukují tvorbu kořínků, ale také mají schopnost podporovat jejich elongaci a laterální růst (Niemi a kol., 2004).

Použití auxinu jako složky média nebo auxin-produkující ECM houby pro zakořeňování rostlinek musí na první pohled vést k stejné reakci, avšak v praxi se objevují určité rozdíly. Například hypokotyly *Pinus sylvestris* v médiu obsahujícím 5 μ M IAA nevytvářely žádné kořeny, ale inokulace *Hebeloma cylindrosporum* bez přídavku exogenního auxinu přispěla k jejich tvorbě. Na druhé straně, na hypokotylech *Pinus pinaster* nebyl pozorován rozdíl mezi účinky exogenní IAA a houby.

Druh *Amanita muscaria* (AM) zatím nebyl zaznamenán jako druh užitečný pro SE, avšak má potenciál tvořit mykorhizu se semenáčky jehličnanů (*Larix decidua* Mill., *Picea abies* (L.) Karst, a *Pinus sylvestris* L.) v podmínkách *ex vitro* (Kottke, 1987).

Semenáčky s mykorhizou však často mají více vyvinutý kořenový systém a lépe se aklimatizují v *ex vitro* podmínkách ve srovnání s nemykorhizními rostlinami (Normand a kol., 1996; Oliveira a kol., 2003).

Je nutné brát v úvahu, že výsledek interakce je značně závislý na vlastnostech genotypu jak ESM, tak i houby (Krajňáková a kol., 2012; Niemi a kol., 2004). Některé druhy ECM hub mohou být k embryím velmi agresivní. Například mohou mít velkou rychlost růstu a prorůstat embryi nacházejícími se příliš blízko (Sasa a Krogstrup, 1991). Zralé rostliny jsou schopny kontrolovat rozvoj mycelia ECM hub v pletivech kořenů přes molekulární mechanismy a některé sekundární metabolity (Gryndler a kol., 2004). Zkoumání těchto vlastností u somatických embryí však dosud nebyla věnována pozornost.

2.2.3 Anatomicko-fyziologický popis druhu muchomůrka červená (*Amanita muscaria* L. ex Fr. Hook.)

Muchomůrka červená tvoří mykorhizní symbiózu se smrkem, břízami, méně často s borovicí. Plodnice se vyskytují často ve skupinách. Klobouk má velikost 80-180 mm, v mládí kulovitý, pak polokulovitý až vyklenutý, nakonec plochý až mělce vmáčklý; okraj v mládí spojený s vrcholem stopky bílým blanitým závojem, v dospělosti krátce rýhovaný. Pokožka klobouku oranžově až šarlatově červená, v dospělosti se soustředně uspořádanými, tlustými, většinou postupně odpadávajícími, bílými až bělavými útržky vela. Lupiny bílé až bělavé. Stopka 80-200 × 12-



Obrázek č. 9 – muchomůrka červená (*Amanita muscaria* L. ex Fr. Hook.).

30(-40) mm, válcovitá s hlízovitou bází, bílá, nahoře s bílým, hladkým, blanitým, ve stáří ± mizejícím prstenem (vespod však někdy nesoucím bradavkovité zbytky vela), dole na hlíze a těsně nad ní, s pásy bílých až nažloutlých bradavkovitých útržků vela. Zbytky plachetky na bázi stopky netvoří pochvu, ale jsou bradavkovité. Dužnina bílá, pod pokožkou klobouku žlutá. Výtrusy 9-12 × 6,5-9 μm, široce elipsoidní, neamyloidní. Mírně jedovatá (působí lehké otravy bez trvalých následků). Hojně se vyskytuje v lesích i mimo les na kyselých půdách. Tvoří disperzní kolonii. Obsahuje toxiny kyseliny ibotenové a muscimol (Holec, 2012; Gryndler, 2004).

2.2.4 Anatomicko-fyziologický popis druhu čechratka podvinutá (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.)

Mykorhizní symbiont jehličnanů i listnáčů, zejména bříz a smrku. Klobouk 40-150 mm, v mládí vyklenutý, pak plochý až vmáčklý, s okrajem dlouho podvinutým, v mládí krátce vroubkovaným. Pokožka klobouku hnědookrová nebo rezavě až olivově hnědá, otlačením rezavohnědnoucí, v mládí na okraji světleji vločkatá, vláknitě plstnatá, za vlhka mírně lepkavá. Lupiny husté, hojně vidličnatě členěné, krátce sbíhavé, v mládí žlutookrové, poraněním hnědnoucí, pak celé rezavě hnědé, měkké, snadno oddělitelné od dužniny. Stopka 40-80 × 8-20

mm, žlutookrová až hnědá, poraněním hnědnoucí, suchá. Dužnina žlutavá až hnědavá, na řezu červenavě hnědnoucí. Vůně nakyslá, chuť mírná až svíravá. Je prudce jedovatá (působí těžké otravy trvale poškozující organismus, většinou ale ne smrtelné). Výtrusy 7-11 × 5-6,5 μm, elipsoidní, hladké. Výtrusný prach olivově hnědý až tmavě červenohnědý. Přežky přítomny. Hojně se vyskytuje v lesích i mimo les na kyselých půdách. Tvoří disperzní kolonii (Holec, 2012; Gryndler, 2004). V kultuře *in vitro* produkuje látky podobné cytokininu jako zeatin, 6-(γ,γ-Dimethylallylamino) purinribosid, zeatinribosid (Strzelczyk a kol., 1985).



Obrázek č. 10 – čechratka podvinutá (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.)

3 CÍLE PRÁCE

Cíle práce jsou:

1. Zkoumání vlivu různých koncentrací kyseliny abscisové na maturaci somatických embryí bez přítomnosti osmotik.
2. Zkoumání efektu různých růstových regulátorů (IBA, GA3) a dvou druhů ektomykorhizních hub na konverzi somatických embryí rostliny, zejména na vývoj kořene konvertovaných rostlin.
3. Porovnání výsledků a navržení optimálního postupu při maturaci a konverzi pro oba druhy jehličnanů.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

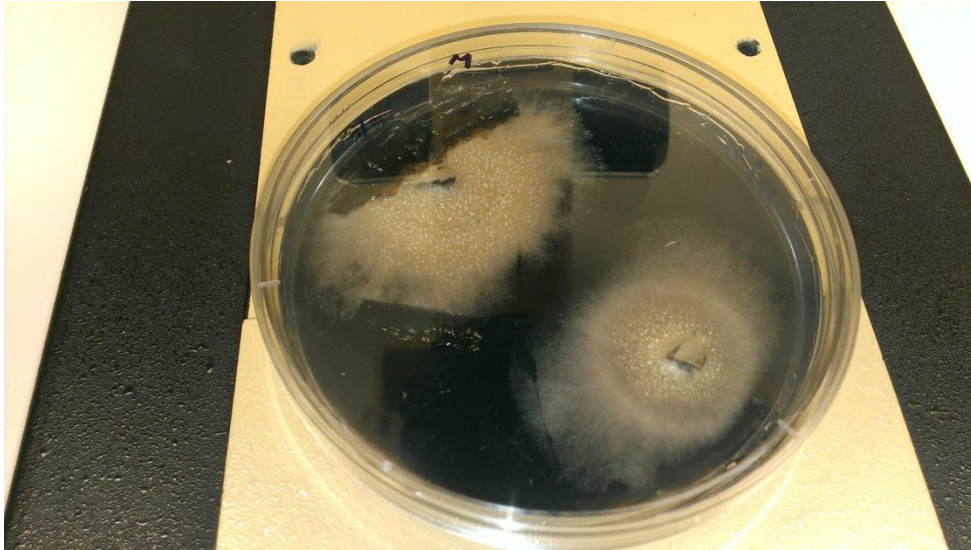
Pro založení pokusu byly odebrány 3 buněčné linie smrku ztepilého a 3 buněčné linie jedle bělokoré (tabulka č. 1) ve stáří 3-4 roků, původ – Školní lesní podnik „Masarykův les“ Křtiny, okres Blansko v Jihomoravském kraji, odvozené na pracovišti explantátových kultur Ústavu biologie rostlin. Buněčné linie III-2-11 u *Picea abies* a II-3-5 u *Abies alba*, které v předcházejících experimentech nevykazovaly schopnost tvořit dodatečné množství somatických embryí, byly vybrány záměrně, aby bylo možno posoudit, zda je možné schopnost maturace ovlivnit růstovými regulátory i u těchto linií.

Tabulka č. 1 – Buněčné linie smrku a jedle.

<i>Picea abies</i>	<i>Abies alba</i>
III-3-3	II-2-10
IV-3-13	II-3-5
III-2-11	II-4-5

4.1.2 Kultury hub

Kultury mykorhizních hub AM (*Amanita muscaria*) a PI (*Paxillus involutus*) laskavě poskytli kolegové z Katedry botaniky Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Tyto druhy byly vybrány, protože jsou přirozenými symbionty smrku ztepilého a jedle bělokoré *in vivo*. V době založení pokusu nebyly nalezeny žádné zmínky o výsledcích interakce mezi uvedenými houbami a somatickými embryi jedle a smrku anebo o použití AM v somatické embryogenezi jehličnanů.



Obrázek č. 11 – Kultura PI v Petriho misce.

4.1.3 Kultivační média

Složení médií zpravidla používaných v laboratoři Explantátových kultur Ústavu biologie rostlin je založeno na předchozích pracích. Jako proliferační médium pro smrk bylo použito médium LP (Bozhkov, von Arnold, 1998), pro jedli – MS (Murashige, Skoog, 1962). Jako maturační médium bylo použito MS pro oba druhy. Původní koncentrace jednotlivých složek pro oba druhy jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Tabulka č. 2 – Složení základního média pro jedli a smrk.

Komponent média	MS (<i>Abies alba</i>)	LP (<i>Picea abies</i>)
Makroprvky	mg.l⁻¹	mg.l⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	600
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	180
KH ₂ PO ₄	170	170
Mikroprvky	mg.l⁻¹	mg.l⁻¹
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,415
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	4,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0125
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	6,95
Na ₂ EDTA	37,3	
EDTA		9,31
Vitamíny a organické sloučeniny	mg.l⁻¹	mg.l⁻¹
Tiamin - HCl	0,1	2,5
Pyridoxin - HCl	0,5	0,5
Kyselina nikotinová	0,5	1
Myo-inositol	100	100
Glycin	2	2
Glutamin	500	450
Kazeinový hydrolyzát	1000	500
Regulátory růstu	mg.l⁻¹	mg.l⁻¹
2,4-D		2,0
BAP	1,0	1,0
Sacharóza	20 g.l⁻¹	20 g.l⁻¹
Phytigel	3,0 g.l⁻¹	3,5 g.l⁻¹

Tabulka č. 3 – Složení proliferačního média pro jedli a smrk.

Komponent média	MS (<i>Abies alba</i>)	LP (<i>Picea abies</i>)
Makroprvky	4,53 g	2 g
Mikroprvky	103,33 g	35,375 g
Vitamíny a organické sloučeniny	103,1 mg	106 mg
Glutamin	500 mg	450 mg
Kazeinový hydrolyzát 0,05%	1 g	500 mg
Regulátory růstu	1 mg	3 mg
pH (upravit)	5,5-5,8	5,7-5,9
Sacharóza	-	20 g
Maltóza	20 g	-
Phytigel	3 g	3,5 g

Tabulka č. 4 – Složení maturačního média pro jedli a smrk.

Komponent média	MS (<i>Abies alba</i>)	MS (<i>Picea abies</i>)
MS Makro+Mikro (1/2 konc.)	2,15 g	-
Makroprvky	-	2,15 g
Vitamíny	1 ml	1 ml
Myo-inositol	-	100 mg
Kazeinový hydrolyzát 0,05%	500 mg	1 g
Maltóza 83,3 µM	30 g	-
pH (upravit)	5,7	5,7-5,8
Sacharóza	-	27 g
Phytigel 0,25%	2,5 g	3,5 g
Glutamin 1,7 µM	0,248 g	500 mg
Regulátory růstu (ABA)	Viz tabulku č. 7	

Tabulka č. 5 – Složení tekutého kultivačního média.

Komponent média	Množství
MS Makro+Mikro elementy	2,15 g
Vitamíny	1 ml
Kazeinový hydrolyzát 0,05%	1 g
pH (upravit)	5,7
Sacharóza	20 g
Glutamin	500 mg

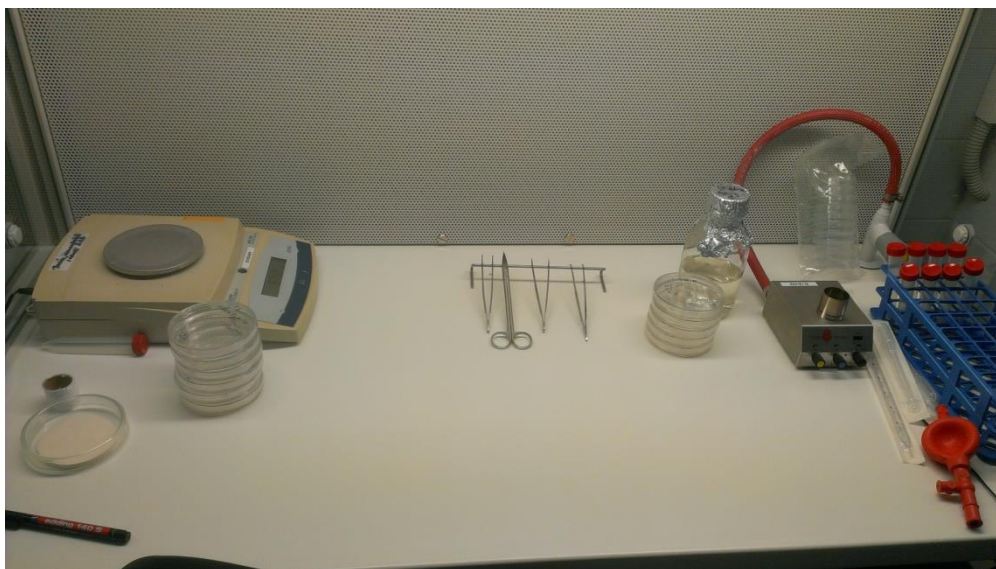
Tabulka č. 6 – Složení základního (bez fytohormonů) konverzního média pro jedli a smrk.

Komponent média	<i>Abies alba</i>	<i>Picea abies</i>
MS Makro+Mikro (1/2 konc.)	2,2 g	2,2 g
Vitamíny	1 ml	1 ml
Aktivní uhlí	1 g	1 g
pH (upravit)	5,5-5,8	5,5-5,8
Sacharóza	-	15 g
Maltóza	15 g	-
Agar	7 g	7 g

4.2 Metody a příprava pokusu

4.2.1 Maturační média

Prvním cílem bylo najít nejvhodnější koncentraci ABA, která by umožňovala získávat nejvyšší procento maturovaných embryí. Pro maturační pokus bylo proto připraveno několik koncentrací ABA, ze kterých by pak byla vybrána ta nejúčinnější pro každý druh nebo buněčnou linii.



Obrázek č. 12 – Pomůcky připravené pro přenos ESM na maturační médium.

Je nutno zdůraznit, že do maturačního média se nepřidával žádný PEG (tabulka č. 4). Souběžně s touto prací se konala ještě další, která byla zaměřena na sledování vlivu PEG na chod maturace u jedle a smrku. Jejich výsledky pak bylo možné porovnat mezi sebou. Pro každou koncentraci bylo provedeno šest opakování od každé buněčné linie (3 g ESM plus 5 ml tekutého kultivačního média, stejného pro smrk a jedli (tabulka č. 5)). Směs je třeba zvortexovat. Pak se z této směsi odebíral cca 0,5 ml a přenášel na filtrační papír jedné z šesti Petriho misek. Filtrační papír s embryi se každé 2 týdny přenášel na nové médium (transfer). Pro *Picea abies* byly provedeny celkem 3 transfery, *Abies alba* vyžadovala 6 transferů.

Tabulka č. 7 – Jednotlivé koncentrace ABA v maturačních médiích.

Koncentrace ABA	<i>Abies alba</i>	15 μ M	30 μ M	45 μ M	60 μ M	75 μ M
Koncentrace ABA	<i>Picea abies</i>	5 μ M	15 μ M	30 μ M	45 μ M	

U *Abies alba* byly používány koncentrace 45 μ M, 60 μ M a 75 μ M prvních 6 týdnů maturace, následujících 6 týdnů byla její hodnota snížena na 30 μ M. Maturace tohoto druhu trvala celkem 12 týdnů (v období 31. 5. 2014 - 23. 8. 2014). Buněčná linie II-2-10 dosáhla maturačního stádium o 2 týdny později, 6. 9. 2014.

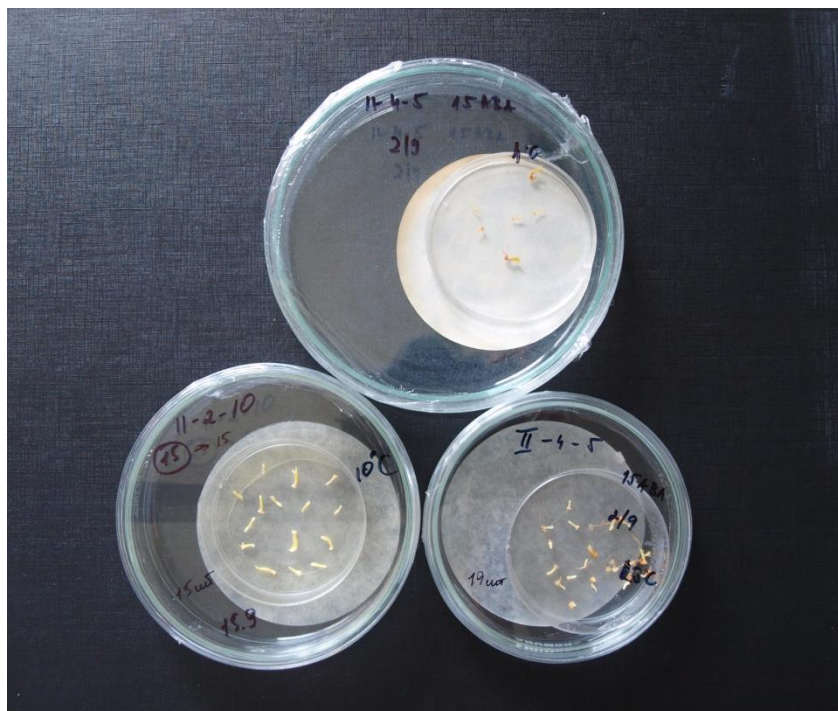
U *Picea abies* maturace trvala 6 týdnů (při původních koncentracích ABA). Vzhledem k její kratší délce, byla prováděna v období od 1. 10. 2014 do 12. 11. 2014.

Po skončení doby maturace byla každá miska vyhodnocena: bylo sečteno množství raných somatických embryí, prekotyledonárních a kotyledonárních embryí. Data jsou uvedena v tabulce č. 9 a 10 uvedené níže.

4.2.2 Desikace

Získaná kotyledonární embrya z každé koncentrace ABA byla rozdělena na 3 skupiny, v každé proces desikace probíhal v temnu při určité teplotě: 4°C (v mrazáku), 10°C (v termostatu), 23°C (v kultivační místnosti). Desikace trvala u obou druhů 3 týdny. U *Abies alba* byly z důvodu malého množství zralých embryí na desikaci nachystány všechny koncentrace všech buněčných linií a podrobeny desikaci i embrya i s jednou dělohou s cílem vyzkoušet, zda fytohormony ovlivní vznik nových děloh. Ze stejného důvodu skupiny obsahovaly 1-35 embryí. U buněčných linií II-3-5 a II-4-5 desikace probíhala od 2. 9. 2014, u II-2-10 od 15. 9. 2014. U *Picea abies* byla

desikaci podrobena embrya z variant koncentrace 15 μM ABA (buněčná linie III-3-3), 15 μM ABA a 30 μM ABA (buněčná linie IV-3-13).



Obrázek č. 13 – Petriho misky připravené k desikaci, *Abies alba* (z levé strany – embrya před desikací, z pravé strany a nahoře – embrya po 2 týdnech desikace).

4.2.3 Konverzní média

Pro konverzi byly uvaženy 4 varianty germinačního média (GM) – uvedeny v tabulce č. 8 níže.

Tabulka č. 8 – Varianty konverzních médií.

Varianta	Složení
1	GM bez fytohormonů (kontrola)
2	GM + 0,2 μM IBA
3	GM + 1,4 μM GA3 (4 dny v temnotě), přesazení na základní GM bez RR
4	GM bez fytohormonů + <i>Amanita muscaria</i> nebo <i>Paxillus involutus</i>

Po desikaci byly 3 skupiny embryí rozděleny do dalších 4 skupin a přeneseny na germinační média do kultivačních nádob (Duchefa). U skupin, které obsahovaly příliš málo

embryí na to, aby byl proveden pokus se čtyřmi variantami médií, byly nachystány pouze některé z těchto variant (viz tabulky č. 11-13). Jedna nádoba obsahující médium určité varianty byla rozdělena čárkou do 2 částí, do každé byla vysazena embrya různých koncentrací ABA (viz obrázek č. 16). Ve variantě GM 4 byly spolu s embryi do kultivačních nádob nebo do Petriho misek rovnoměrně umístěny kousky mycelia hub AM nebo PI, celkově 3 kusy, každý o velikosti 0,5 x 0,5 cm na nádobu ve vzdálenosti 0,5-1,0 cm od embryí (obrázek č. 20, C a E). Po 4 týdnech konverze byla získaná konvertovaná embrya morfologicky vyhodnocena a popsána.



Obrázek č. 14 – Kultivační nádoby obsahující embrya jedle.

4.3 Experimentální design a statistické zpracování výsledků

Hodnocení pokusů probíhalo vizuálně přes binokulární lupu PZO Poland a reakce embryí na jednotlivé varianty maturačních a konverzních médií byly fotograficky zaznamenány. K fotografování byl použit fotoaparát Olympus E 450. Pro zjištění morfometrických parametrů konvertovaných embryí byl použit program ImageJ. Pro zpracování dat a vytvoření tabulek byl použit program Microsoft Excel 2007.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv kyseliny abscisové na maturaci

Po ukončení maturace bylo na každé Petriho misce pomocí binolupy spočteno množství raných somatických embryí, prekotyledonárních embryí a kotyledonárních embryí pro všechny buněčné linie. V tabulkách č. 9 a 10 je uvedena suma z celkového (6) počtu misek. Výsledky byly dosaženy z jednoho opakování. Provedení více opakování nebylo možné provést z důvodu časového omezení.

Mezi buněčnými liniemi smrku projevila největší výkonnost linie III-3-3: 250 kotyledonárních embryí při koncentraci 15 μM ABA a 226 kotyledonárních embryí při koncentraci 45 μM ABA. Koncentrace 5 a 30 μM ABA nebyly stejně účinné, ale ve srovnání s jinými buněčnými liniemi je počet zralých embryí význačně vyšší. Stojí za zmínku, že uvedená buněčná linie má velký potenciál souběžného dozrávání – na konci maturace se převážná část embryí nacházela v jednom stádiu.

Pro buněčnou linii IV-3-13 se nejvhodnější koncentrací prokázala být 30 μM ABA. Podle výsledků lze říci, že tato buněčná linie lépe reaguje na koncentrace kyseliny abscisové nižší než 45 μM , protože při dotyčné koncentraci maturace vůbec neproběhla. Buněčná linie III-2-11 reagovala na každou koncentraci ABA shodným způsobem, totiž nevytvářela takřka nic.

Tabulka č. 9 – Počet embryí po maturaci, *Picea abies* (EP – rané somatické embryo, P – prekotyledonární stádium, C – kotyledonární stádium).

Koncentrace ABA, μM	5	15	30	45
Buněčná linie	III-3-3			
EP	8	9	6	13
P	20	13	9	20
C	180	250	100	226
Buněčná linie	III-2-11			
EP	0	0	0	0
P	1	0	0	3
C	0	0	0	1
Buněčná linie	IV-3-13			
EP	7	10	1	0
P	36	63	10	0
C	30	40	110	0

Co se týká jedle, maximální počet kotyledonárních embryí (102) byl získán u buněčné linie II-2-10 po 14 týdnech při koncentraci 15 μM ABA. Čtyřicet šest kotyledonárních embryí se vytvořilo při 60 μM ABA. Ostatní koncentrace byly pro tuto buněčnou linii mnohem méně účinné. Například koncentrace 75 μM ABA způsobila vývoj pouze 3 kotyledonárních a 15 prekotyledonárních embryí. Je pozorován vysoký počet raných somatických embryí, avšak prodloužení doby maturace by vedlo k nekrotizaci embryogenních pletiv.

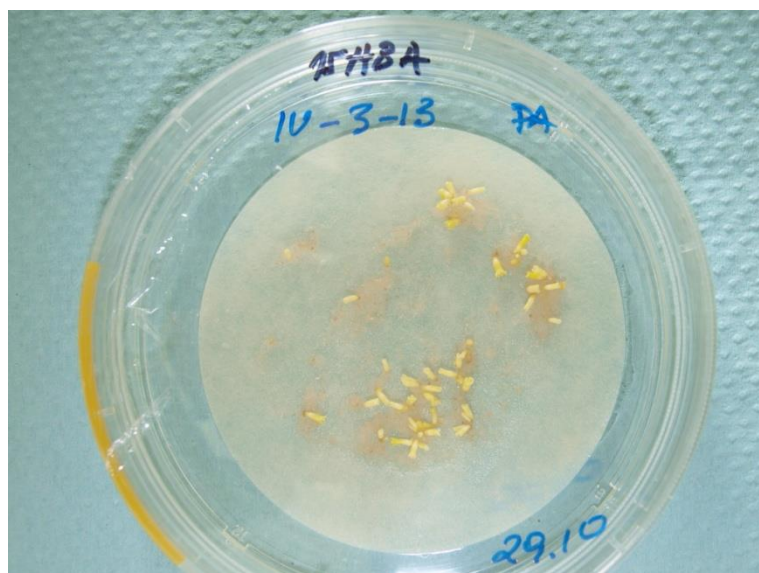
Buněčná linie II-4-5 po 12 týdnech maturace vytvořila celkově 87 zralých embryí při koncentraci 45 μM ABA a 77 při koncentraci 30 μM ABA. Jiné koncentrace byly 2 až 4krát méně efektivní. Nejhorší výsledek má koncentrace 60 μM kyseliny abscisové – 16 kotyledonárních embryí.

Třetí buněčná linie II-3-5 nejlépe reagovala na koncentrace 60 a 75 μM ABA. Maximální počet kotyledonárních embryí je 49. Při koncentraci 45 μM nevytvářela takřka nic, a při koncentracích 30 μM a méně se počet kotyledonárních embryí značně snížil.

Stojí také za zmínku, že embrya s více než 5 dělohami nebyla pozorována.

Tabulka č. 10 – Počet embryí po maturaci, *Abies alba* (EP – rané somatické embryo, P – prekotyledonární stádium, C – kotyledonární stádium).

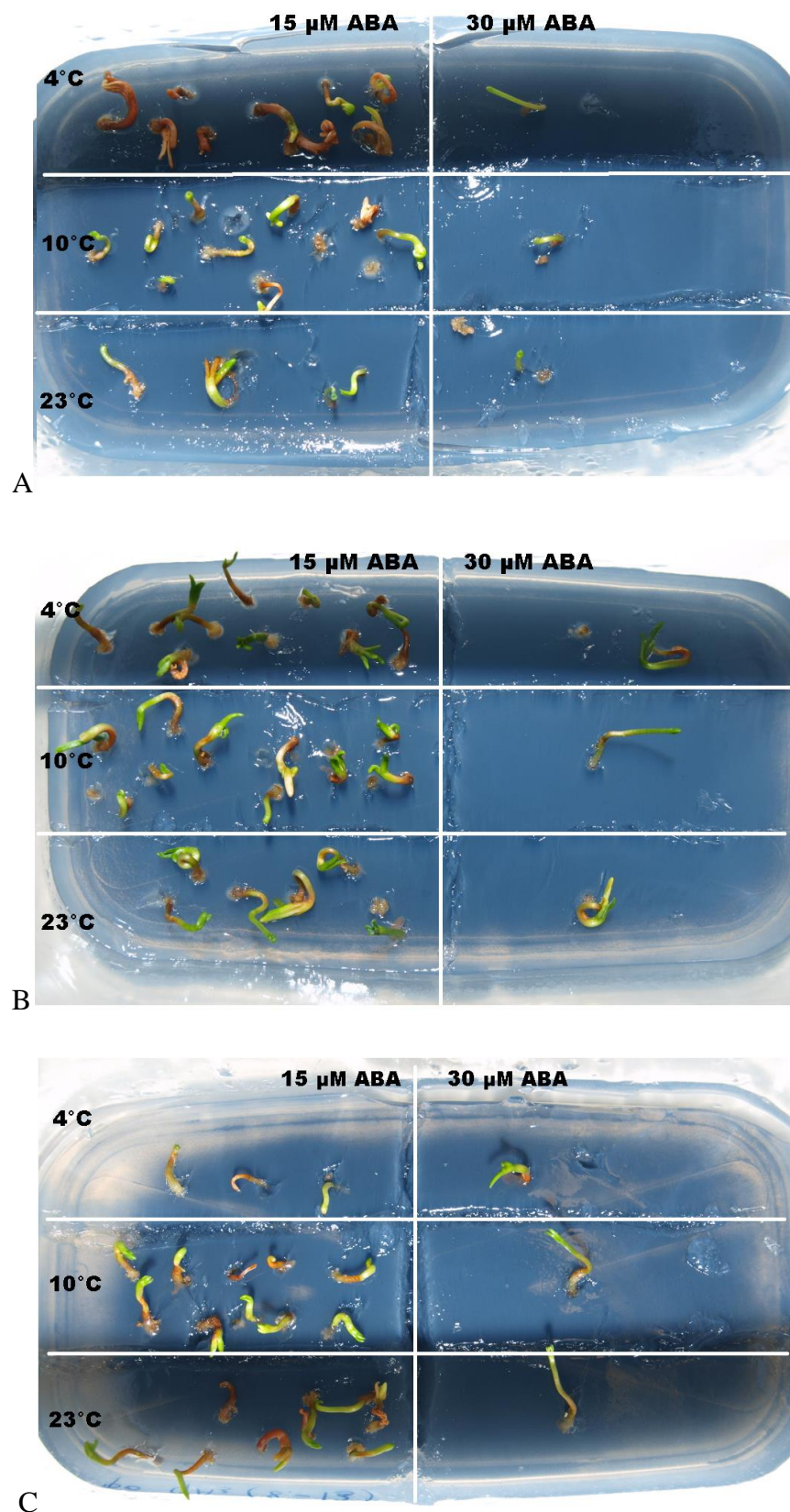
Koncentrace ABA, μM	15	30	45	60	75
Buněčná linie	II-3-5				
EP	3	11	2	13	14
P	3	5	0	8	5
C	10	31	2	49	36
Buněčná linie	II-4-5				
EP	18	142	78	9	20
P	14	47	32	4	9
C	26	77	87	16	37
Buněčná linie	II-2-10				
EP	192	142	68	168	68
P	119	34	37	74	15
C	102	12	14	46	3



Obrázek č. 15 – Kotyledonární embrya smrku v průběhu maturace, buněčná linie IV-3-13, 29.10.14.

5.2 Desikace

Během konverze nebyl ani u *Abies alba*, ani u *Picea abies* pozorován žádný rozdíl mezi vlivem teplot 10°C a 23°C, co se týká vlivu na proces konverze somatických embryí a jejich tvar. Teplota 4°C byla příliš nízká a způsobila ztrátu většího množství vody, což bylo možné pozorovat pouhým okem jak na samotných embryích, tak na filtračním papíru, který byl po 2 týdnech desikace zcela suchý (obrázek č. 13). Embrya však neztratila životaschopnost a během konverze pokračovala v růstu.



Obrázek č. 16 – Příklad působení desikačních teplot po měsíci germinace, buněčná linie II-2-10, *Abies alba* (A – GM 1; B – GM 2; C – GM 3).

5.3 Vliv kyseliny abscisové na následnou konverzi (GM 1 bez fytohormonů)

Jak už bylo uvedeno v kapitole 4.2.3, po desikaci následovalo stádium konverze. Níže jsou uvedeny výsledky týkající se pouze *Abies alba*, protože kultivační nádoby s embryi smrku byly během germinace kontaminovány a z tohoto důvodu nebylo jejich vyhodnocení možné. Stojí za připomenutí, že množství embryí jedle získané při různých koncentracích ABA po maturaci se značně lišilo, a proto data uvedena v tabulkách č. 11-13 nejsou dostatečně spolehlivá. Výsledky byly dosaženy z jednoho opakování. Provedení více opakování nebylo možné provést z důvodu časového omezení.

U více než 50% konvertovaných embryí vedla kultivace na GM 1 bez fytohormonů následně k nekróze, zejména u buněčných linií II-3-5 a II-4-5, kde k tomu došlo takřka při všech koncentracích ABA (s výjimkou 30 μM a 75 μM u buněčné linie II-3-5 a 75 μM u buněčné linie II-4-5). U embryí, která měla několik děloh, byl pozorován jejich souběžný růst, například u buněčné linie II-3-5 při 30 μM a 75 μM ABA. Hypokotyly byly značně zakřivené u všech buněčných linií (obrázek č. 17). Růst hlavního kořínku nebyl pozorován.

Tabulka č. 11 – Průměrné délky hypokotyly a děloh u *Abies alba* na konci konverze, GM 1 (N – nekróza celých konvertovaných embryí, * - počet souběžně rostoucích děloh 2 až 5).

ABA, μM	II-2-10		II-3-5		II-4-5	
	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm
15	4,65	2,286	N	N	N	N
30	6,663	0,726	7,905	4,585*	N	N
45	10,333	1,744	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N
75	6,527	4,804	11,945	5,303*	5,414	0,912



Obrázek č. 17 – Konvertovaná embrya jedle po 4 týdnech konverze na GM 1, vybrané koncentrace (A – 15 µM ABA; B – 30 µM ABA; C – 60 µM ABA).

5.4 Vliv auxinu na konverzi (GM 2)

Byl pozorován elongační účinek IBA na hypokotyl a dělohy u všech buněčných linií. Dělohy rostly souběžně. Měly tmavší barvu, což bylo možné odhalit pouhým okem při porovnání s konvertovanými embryi jiných variant. Avšak tento jev je nutné potvrdit experimentálně. U buněčné linie II-2-10 auxin způsobil zakřivení hypokotylu. Měl omezující účinek na vznik nekrózy (asi 15% konvertovaných embryí z celku se nekrotizovalo úplně, u ostatních byla nekróza pozorována na kořenových částech). Z obrázku č. 18 C je patrné, že u některých embryí se vyskytují struktury podobné kořenům.

Tabulka č. 12 – Průměrné délky hypokotylu a děloh u *Abies alba* na konci konverze, GM 2 (N – nekróza celých konvertovaných embryí, * – počet souběžně rostoucích děloh 2 až 5, -- data nejsou).

ABA, μM	II-2-10		II-3-5		II-4-5	
	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm
15	6,491	3,71*	-	-	7,958	1,589
30	13,855	3,376*	11,902	9,495*	N	N
45	6,773	5,131*	-	-	10,576	5,665*
60	4,953	3,395	7,549	10,06*	N	N
75	-	-	15,85	5,859*	11,674	4,152*



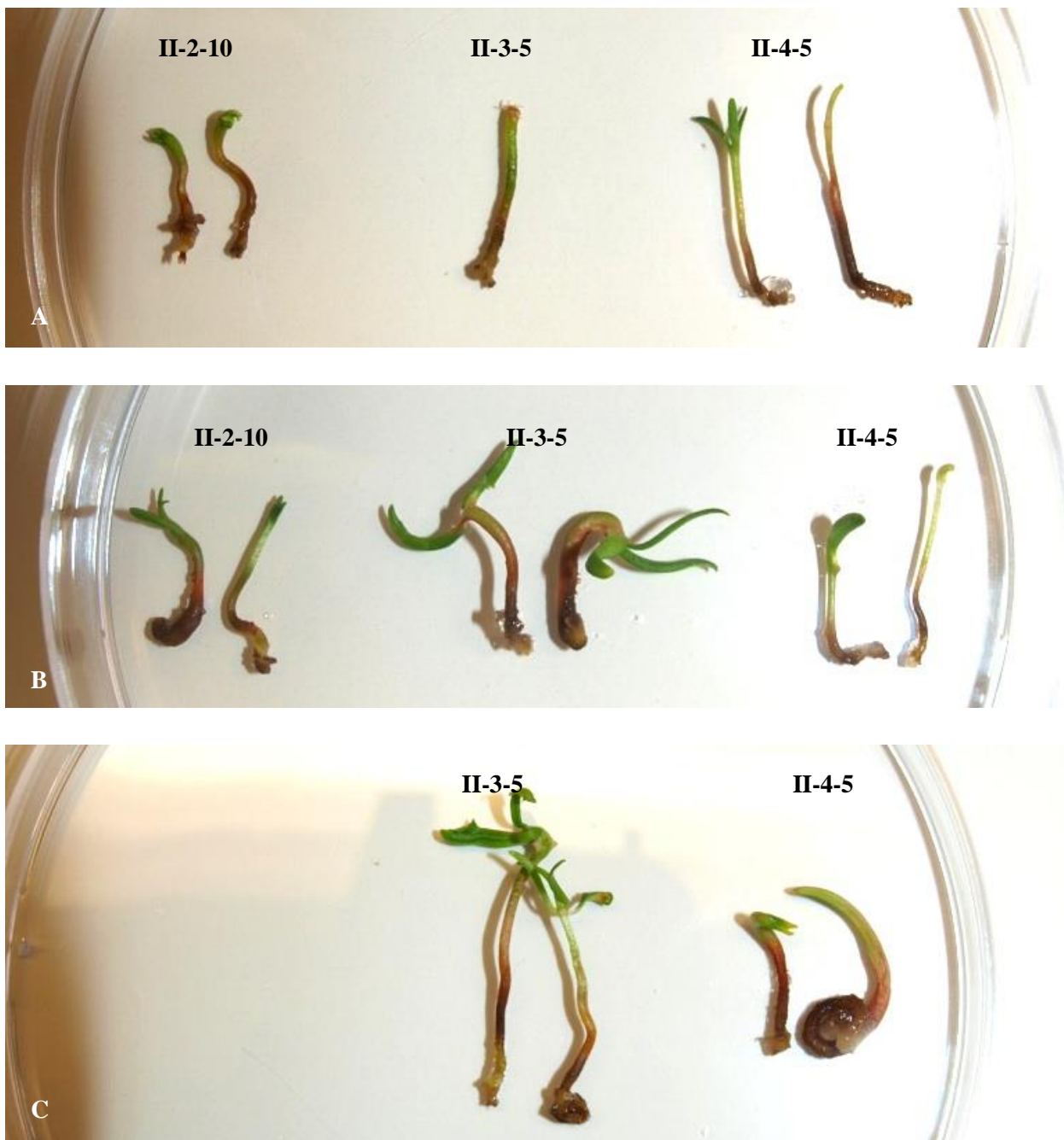
Obrázek č. 18 – Konvertovaná embrya jedle po 4 týdnech konverze na GM 2, vybrané koncentrace (A – 15 μM ABA; B – 60 μM ABA; C – 75 μM ABA).

5.5 Vliv kyseliny gibberelové na konverzi (GM 3)

Je možné říci, že v přítomnosti kyseliny gibberelové se nekróza zpomalila a byla pouze na kořenových částech. Působila elongaci hypokotylu při všech koncentracích ABA, růst všech vytvořených děloh, a to u buněčné linie II-2-10 při všech koncentracích ABA, u buněčné linie II-3-5 při 30 μM a 75 μM ABA, u buněčné linie II-4-5 při koncentraci 15 μM ABA.

Tabulka č. 13 – Průměrné délky hypokotylu a děloh u *Abies alba* na konci konverze, GM 3 (* - počet souběžně rostoucích děloh 2 až 5, - - data nejsou).

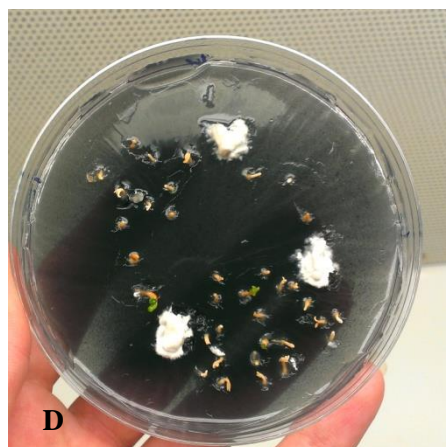
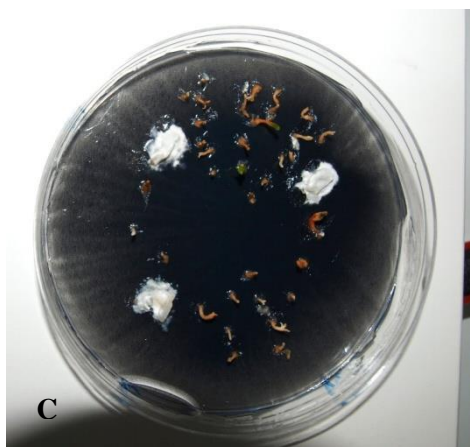
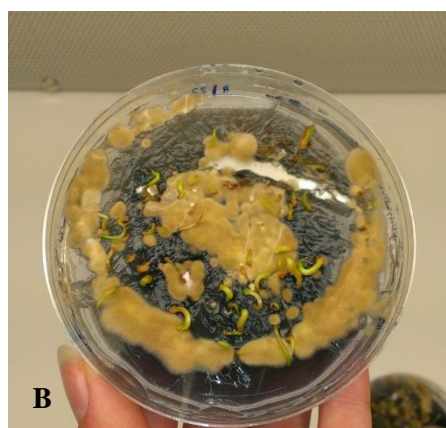
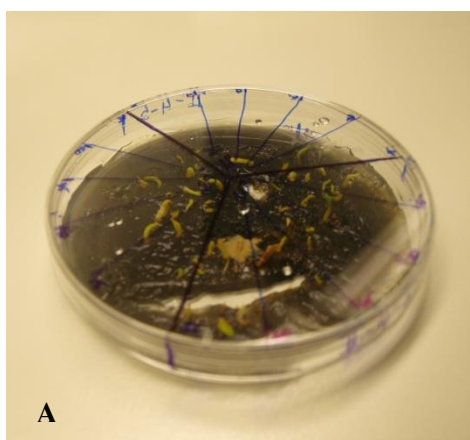
ABA, μM	II-2-10		II-3-5		II-4-5	
	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm	hypokotyl, mm	dělohy, mm
15	7,509	4,649	13,757	0	12,881	6,025*
30	10,047	3,962*	13,5	10,249*	10,222	4,651
45	18,224	4,533*	-	-	13,53	4,462
60	7,628	2,909*	11,973	8,899	10,634	5,083
75	-	-	18,12	7,54*	8,742	7,075



Obrázek č. 19 – Konvertovaná embrya jedle po 4 týdnech konverze na GM 3, vybrané koncentrace (A – 15 μM ABA; B – 30 μM ABA; C – 75 μM ABA).

5.6 Vliv ektomykorhizních hub na konverzi (GM 4)

První pokus byl založen ihned po desikaci, 24. 9. 2014 (obrázek č. 20, A-D). Druhý pokus byl založen 13. 11. 2014 s konvertovanými embryi, odebranými při ukončení a vyhodnocování jiných GM variant (obrázek č. 20, E-G). Předpokládám, že předchozí pokus nebyl úspěšný zejména z důvodu velikosti konvertovaných embryí a relativně rychlého (PI) nebo pomalého (AM) růstu mycelia. Po 4,5 týdnech mycelium PI opět pokrývalo celý povrch média. Avšak ani podruhé nebyly pozorovány žádné kladné účinky na vývoj konvertovaných embryí, zejména kořínků (obrázek č. 20).





Obrázek č. 20 – jedle, GM 4 (A – 13. 11. 2014, začátek první kultivace s PI; B – po 4 týdnech; C 13. 11. 2014, začátek kultivace s AM; D – po 4 týdnech; E – 13. 11. 2014, začátek druhé kultivace konvertovaných embryí, F – 16. 12. 2014, konec kultivace, G – konvertovaná embrya na konci kultivace).

6 DISKUZE

Fytohormony jako jedna z nejdůležitějších složek živného média řídí vývoj somatických embryí, a proto je jejich správná koncentrace jedním z faktorů ovlivňujících konečný úspěch somatické embryogeneze.

Vyzkoušení několika koncentrací ABA poskytlo možnost určit nejúčinnější koncentrace pro každou buněčnou linii. Jako nejlepší se pro jednotlivé linie prokázaly koncentrace 15 μM ABA pro III-3-3, 30 μM ABA pro IV-3-13 u *Picea abies*, 15 μM ABA pro II-2-10, 45 μM ABA pro II-4-5 u *Abies alba*. Buněčné linie III-2-11 a II-3-5 tvořily nízký počet kotyledonárních embryí nezávisle na tom, zda koncentrace ABA byla nízká či vysoká. Podle výsledků je účinnou koncentrací pro smrk a jedli 15 až 45 μM ABA. Tato data odpovídají i výsledkům jiných autorů na *Picea abies*, kde vyšší koncentrace ABA (23 a 38 μM) zvyšovaly počet zralých kotyledonárních embryí na 1 cm^2 ve srovnání s 7,5 ABA μM (Mauleová, Vítámvás, 2007). *Abies alba* i někteří další zástupci rodu *Abies* podle jiných autorů (např. Vooková a kol., 1997; Schuller a kol., 2000) vyžadují mnohem menší koncentrace ABA pro úspěšnou maturaci, například 5 až 20 μM ABA. Z výsledků této práce vyplývá, že není možné určit jednu konkrétní koncentraci ABA pro maturaci, která by byla funkční pro všechny nebo většinu genotypů daného druhu (Szczygiel, Kowalczyk, 2001). Je třeba provést testování každé buněčné linie a najít pro ni nejúčinnější koncentrace ABA.

Počet děloh u zralých kotyledonárních embryí jedle nebyl vyšší než 5. Na konverzních médiích se embrya pouze zvětšovala a fytohormony nepůsobily během 4 týdnů konverze iniciací (vznik) nových děloh. V této práci jsem se nezaměřovala na pozorování vlivu koncentrací ABA na morfolonii a anatomii embryí. Podle závěrů předchozí práce (Pinkasová, 2014) důležitějším faktorem není počet děloh, ale přítomnost apikálního meristému, který potenciálně umožňuje další vývoj embrya a zpravidla je přítomen u embryí s již dvěma a více dělohami. Provedeme-li analogii s kořenem, schopnost konvertované rostliny mít kořeny je pravděpodobně ovlivněna právě přítomností kořenového apikálního meristému na konci maturace (Salaj a kol., 2014). Pokud jej embryo nemá, žádné fytohormony nebudou účinné. Pravdivost tohoto předpokladu je třeba ověřit pomocí histologické analýzy.

Je také třeba vzít v úvahu, že některé buněčné linie nemusí mít dostatečný potenciál tvořit somatická embrya (Krajňáková a kol., 2008). Jedním z důvodů může být u těchto genotypů snížená exprese řady homeotických genů a ABA-mediated genů (Wang a kol., 2009). Pro experimenty byly záměrně vybrány i linie, které nevykazovaly dostatečný potenciál v

předcházejících experimentech, aby se prokázalo, zda potenciál tvořit somatická embrya je možné ovlivnit fytohormony či nikoliv. Působení pouze ABA tento potenciál nedokázalo nějak zvýšit. Avšak bylo pozorováno zvýšení počtu a zlepšení kvality odvozených kotyledonárních embryí smrku při přidání aktivního uhlíku do maturačního média (Pullman a kol., 2005).

Co se týká vlivu desikačních teplot na vývoj somatických embryí, v této práci nebyl pozorován vliv různých teplot na následující konverzi embryí *Abies alba*. Pro druhy rodu *Picea* bylo jinými autory zjištěno, že nejvyšší počet plnohodnotných konvertovaných embryí je u *Picea glauca* (58 % nemělo žádné morfologické poškození, dělohy a kořeny se vyvíjely normálně), pokud před germinací probíhá konverze v délce 8 týdnů při teplotě 5°C (Pond a kol., 2002). Konrádová a kol. (2003) navrhuje místo standardního procesu desikace podrobit somatická embrya *Picea abies* ošetření chladem – 3 týdny za tmy při teplotě 4 °C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), přičemž uvádí, že toto ošetření zvyšuje obsah rafinózy a jiných endogenních cukrů stejně jako desikace, a proto ji může nahradit.

Přidání GA3 (1,4 μM) do konverzního média u konvertovaných embryí *Abies alba* neindukovalo růst kořenů. Oproti tomu Vookové a kol. (1997) se podařilo pomocí stejné koncentrace dosáhnout žádoucích účinků, totiž růstu kořenů u hybridů jedle. Také IBA (0,2 μM) neměla na formování kořenového systému embryí jedle kladný vliv. Ale v pokusech se smrkem 0,1 μM IBA zcela podpořila klíčení konvertovaných embryí (Vavříčková, 2008). Pokud se tyto dva fytohormony používají, je výsledek jejich působení značně závislý na jejich vzájemném poměru. Například GA3 v přítomnosti vysoké hladiny auxinu inhibuje elongaci kořenu, při malém množství IAA působí opačně. Pokud se používají samostatně, o efektu rozhoduje jejich samotná koncentrace a délka působení. Značnou roli může mít genotyp a druh rostliny (Krajňáková a kol., 2013; George a kol., 2008).

Jedním z faktorů ovlivňujících průběh konverze může být i vlhkost vzduchu uvnitř kultivačních nádob. Nižší vlhkost podporuje regeneraci somatických embryí (Bhojwani, Dantu, 2013). Ke zjištění, zda to mělo významný vliv na konverzi u jehličnanů (v našem případě jedle) by bylo potřeba větší množství experimentálního materiálu. Toto nebylo cílem mé diplomové práce, ale je to jeden z možných směrů dalšího zkoumání při optimalizaci metody.

V praxi byly vyzkoušeny 2 houbové kultury. Sledovalo se jejich chování vůči médiím a embryím. Reakcí *Amanita muscaria* na germinačním mediu byl velmi pomalý růst, tj. její vliv na konverze embryí nebylo možné zaznamenat. Existují i jiná média, která se používají jako germinační pro somatická embrya jehličnanů, tj. potenciálně je lze vyzkoušet jako živné prostředí pro daný druh.

Paxillus involutus naopak rostl velmi rychle a po nějaké době embrya byla myceliem zcela obrostlá, ale ke vzniku a stimulaci růstu kořenu nedošlo. Tento druh zachovává svoji agresivitu i na jiných živných médiích (např. maturačních) a množství a zastoupení fytohormonů v médiích zrychluje nebo zpomaluje jeho růst (Niemi a kol., 1998). Lze ho také úspěšně používat při stimulaci zakořeňování hypokotylů u *Pinus sylvestris* (Niemi a kol., 2002), což svědčí o jeho potenciální užitečnosti pro SE.

Při použití ECM hub v somatické embryogenezi je nezbytné brát v úvahu jak samotné nálezy existence ektomykorhizní symbiózy mezi dřevinou a houbou *in vivo*, tak také stáří dřeviny, při kterém byla ektomykorhizní symbióza nalezena. Je známo, že existují druhy ECM hub, které jsou schopny kolonizovat dřevinu nezávisle na jejím stáří (například u smrku to jsou *Laccaria laccata*, *Suillus luteus*), ale existují i druhy, které tvoří mykorhizu pouze se semenáčky (u smrku *Hebeloma* sp., *Inocybe* sp.) nebo pouze s dospělými dřevinami (*Lactarius* sp., *Russula* sp.). Je pravděpodobně, že stáří dřeviny je zásadní i v případě *in vitro* při práci se somatickým embryem a houbovou kulturou a stanovuje jejich vzájemný vztah.

Možnost použití houbových kultur komplikuje jejich reakce na živná média, která somatická embrya potřebují. Jsou to organismy mající různé nároky na živiny a je zjevné, že ne vždy lze najít rovnovážné řešení, platící pro obě složky dual-systému.

Použitý protokol neobsahoval pre-maturační stádium bez fytohormonů. Během sepsání této práce však byl proveden pokus s *Picea abies* i s tímto krokem a ukázalo se, že pro smrk je ve značné míře efektivnější než postup dle běžného protokolu. Přestože existují některé práce, kde bez tohoto kroku byla získána životaschopná konvertovaná embrya, předpokládám, že je lepší nepřehlížet jej. Potvrzení efektivnosti tohoto kroku lze najít u mnoha jiných autorů. Navíc, značně přínosným může být opakování tohoto stádia mezi maturací a germinací (Salajova a kol., 1996; Salaj, 2003).

7 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo za prvé prozkoumat vliv různých koncentrací kyseliny abscisové na maturaci somatických embryí bez přítomnosti osmotik. Byly použity embryogenní kultury dvou druhů dřevin, *Picea abies* (L.) H. Karst a *Abies alba* Mill. Byla připravena škála různých koncentrací ABA a na konci pokusu se podle výsledků podařilo vybrat nejúčinnější z nich (viz kap. Diskuze). Zároveň se prokázalo, že pouze ABA není schopna ovlivnit potenciál embryogenních kultur tvořit somatická embrya. Zjistila jsem, že embryogenní kultury tvoří somatická embrya i bez osmoticky aktivních látek, ale pro zjištění vlivu osmotik na počet vytvořených embryí by bylo vhodné porovnat výsledky této práce s výsledky maturace na klasickém médiu.

Za druhé, sledovala jsem efekt různých růstových regulátorů (IBA, GA3) a dvou druhů ektomykorhizních hub (PI, AM) na konverzi somatických embryí rostliny, zejména na vývoj kořene konvertovaných rostlin. V této práci se mi nepodařilo ovlivnit tvorbu kořenů u konvertovaných embryí jedle působením fytohormonů, ani přítomností ektomykorhizních hub. Byla zaznamenána reakce houbových kultur na germinační médium, což by mohlo být užitečné při zakládání dalších pokusů.

Doufám, že výsledky mé práce budou užitečné při pokračování studia vlivu fytohormonů na konverzi jehličnanů a dalších *in vitro* pokusech s ektomykorhizními houbami.

8 CONCLUSION

Firstly, the aim of my thesis was to examine the influence of various concentrations of abscisic acid on the maturation of somatic embryos without the presence of osmoticum. Embryogenic cultures of two woody plants, *Picea abies* (L.) H. Karst and *Abies alba* Mill were used. The range of various concentrations ABA was prepared and, according to the results, the most effective one was chosen at the end of the experiment (see the chapter Discussion). At the same time, it has been proven that only ABA is not able to influence the potential of embryogenic cultures to create somatic embryos. I have found out that embryogenic cultures create somatic embryos even without osmotically active substances; nevertheless, it would be suitable to compare the results of this thesis with the results of maturation on basal medium for the discovery of the influence of osmoticum on the number of created embryos.

Secondly, I was observing the effect of various growth regulators (IBA, GA3) and two types of ectomycorrhizal fungi (PI, AM) on the germination of somatic embryos of plants, primarily on the development of the roots of converted plants. In this thesis, I have not managed to influence the creation of roots of converted embryos of fir tree by the influence of phytohormones or by the presence of ectomycorrhizal fungi. The reaction of fungal cultures on germination medium was noticed, which could be useful in founding of other experiments.

I hope that the results of my thesis will be useful in further studies of the influence of phytohormones on the germination of conifers and in other *in vitro* experiments with ectomycorrhizal fungi.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADERKAS P., LELU M. A., LABEL PH., 2001: Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 39 (6): 495–502.

AZCÓN-AGUILAR C., 2009: *Mycorrhizas: functional processes and ecological impact*. Springer, Berlin, 239 s.

BERLETH T., SACHS T., 2001: Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr. Opinion Plant. Biol.*, 4 (1): 57–62.

BHOJWANI S. S., DANTU P. K., 2013: *Plant tissue culture: An introductory text*. Springer, New York, 309 s.

BOZHKO V. P., VON ARNOLD S., 1998: Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiology of Plant.*, 104: 211–224.

CAROLL G. C., WICKLOW D. T., 1992: *The Fungal community. Its organization and role in the ecosystem*. Vyd. 2. CRC Press, New York, 952 s.

CLOUSE S. D., SASSE J. M., 1998: Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 427–451.

COOKE T. J., RACUSEN R. H., COHEN J. D., 1993: The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5 (11): 1494–1495.

ČERMÁKOVÁ V., 2012: *Faktory ovlivňující indukci somatické embryogeneze u jedle bělokoré (Abies alba Mill.) a smrku ztepilého (Picea abies (L.) Karst.)*. Bakalářská práce, Brno, 57 s.

FIND J. L., 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 Science*, 128 (1): 75–83.

GANA A. S., 2010: The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. *African Journal of Biotechnology*, 10 (51): 10330–10334.

GEORGE E. F., HALL M. A., KLERK G.-J. D., 2008: Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; Miscellaneous compounds, s. 227–281.

- In: GEORGE E. F., HALL M. A., KLERK G.-J. D., *Plant propagation by tissue culture 3rd edition*. Springer Netherlands, Dordrecht, 501 s.
- GRYNDLER M., 2004: *Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin*. Vyd. 1. Academia, Praha, 366 s.
- GUEVIN T. G., MICAH V., KIRBY E. G., 1994: Somatic embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies balsamea*. *Plant Cell*, 37 (2): 205–208.
- HAMANN T., 2001: The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Growth Regul.*, 20 (3): 292–299.
- HOLEC J., BIELICH A., BERAN M., 2012: *Přehled hub střední Evropy*. Vyd. 1. Academia, Praha, 624 s.
- HRADILÍK J., 2005: *Rostlinné explantáty*, Vyd. 1. MZLU v Brně, Brno, 85 s.
- JONES R. L., 2013: *The molecular life of plants*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, 742 s.
- KLIMASZEWSKA K., CYR D. R., 2002: Conifer somatic embryogenesis: I Development. *Dendrobiology*, 48: 31–39.
- KONRÁDOVÁ H., GRIGOVÁ M., LIPAVSKÁ H., 2003: Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39 (4): 425–427.
- KORECKÝ J., VÍTÁMVÁS J., 2011: Somatic embryogenesis of the hybrid *Abies cilicica* × *Abies cephalonica*. *Journal of Forest Science*, 57 (9): 401–408.
- KOTTKE I., GUTTENBERGER M., HAMPP R., OBERWINKLER F., 1987: An *in vitro* method for establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings. *Trees*, 1 (3): 191–194.
- KRAJŇÁKOVÁ J., BERTOLINI A., GÖMÖRY D., VIANELLO A., HÄGGMAN H., 2013: Initiation, long-term cryopreservation, and recovery of *Abies alba* Mill. embryogenic cell lines. *In Vitro Cell and Developmental Biology - Plant*, 49 (5): 560–571.
- KRAJŇÁKOVÁ J., BERTOLINI A., ZORATTI L., GÖMÖRY D., HÄGGMAN H., VIANELLO A., 2013: Changes in ATP, glucose-6-phosphate and NAD(P)H cellular levels during the proliferation and

- maturation phases of *Abies alba* Mill. embryogenic cultures. *Tree Physiology*, 33 (10): 1099–1110.
- KRAJŇÁKOVÁ J., HÄGGMAN H., GÖMÖRY D., 2008: Somatic embryogenesis in Greek fir. *Canadian Journal of Forest Research*, 38 (4): 760–769.
- KRAJŇÁKOVÁ J., NIEMI K., GÖMÖRY D., HÄGGMAN H., 2012: Effects of different ectomycorrhizal fungi on somatic embryogenesis of *Abies cephalonica* Loud. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109 (2): 353–361.
- LARSSON E., SITBON F., LJUNG K., VON ARNOLD S., 2008: Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist*, 177 (2): 356–366.
- LATKOWSKA M. J., CHMIEL H., MOLSKA K., 2001: The influence of exogenous cytokinins on the proliferation of embryogenic tissue and somatic embryo maturation of Norway spruce. *Acta Horticulturae*, 560: 441–444.
- LIU C. M., XU Z. H., CHUA N. H., 1993: Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5 (6): 621–630.
- MAULEOVÁ M., VÍTÁMVÁS J., 2007: Differential success of somatic embryogenesis in random gene pool of Norway spruce. *Journal of Forest Science*, 53 (2): 74–87.
- MOK D. W. S., MOK M. C., 2001: Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 89–118.
- MONTALBÁN I. A., DE DIEGO N., MONCALEÁN P., 2010: Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees*, 24 (6): 1061–1071.
- MURALIDHARAN E. M., KALLARACKAL J., 2005: Current Trends in Forest Tree Biotechnology, s. 169–182. In: SRIVASTAVA P. S., NARULA A., SRIVASTAVA S., *Plant biotechnology and molecular marker*. Springer Netherlands, New Delhi, 400 s.
- NIEMI K., KRAJŇÁKOVÁ J., HÄGGMAN H., 1998: Interaction between embryogenic cultures of Scots pine and ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 8 (2): 101–107.
- NIEMI K., HÄGGMAN H., 2002: *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos *in vitro*. *Mycorrhiza*, 12 (5): 263–267.

- NIEMI K., HÄGGMAN H., SAJRALA T., 2002: Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine *in vitro*. *Tree physiology*, 22 (6): 373–381.
- NIEMI K., SARJALA T., CHEN X., HÄGGMAN H., 2007: Spermidine and the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* synergistically induce maturation of Scots pine embryogenic cultures. *Journal of Plant Physiology*, 164 (5): 629–635.
- NIEMI K., SCAGEL C., HÄGGMAN H., 2004: Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers (review). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78 (1): 83–91.
- NORMAND L., BARTSCHI H., DEBAUD J.-C., GAY G., 1996: Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiologia Plantarum*, 98 (4): 759–766.
- OLIVEIRA P., BARRIGA J., CAVALEIRO C., PEIXE A., POTES A. Z., 2003: Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry*, 76 (5): 579–587.
- PINKASOVÁ M., 2014: *Strukturální změny somatických embryí jehličnanů během jejich zrání a konverze v rostliny uplatnitelné v krajinářské tvorbě*. Diplomová práce, Brno, 69 s.
- POND S.E., VON ADERKAS P., BONGA J.M., 2002: Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 38 (4): 334–341.
- PROCHÁZKA S., ŠEBÁNEK J., 1997: *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Academia, Praha, 395 s.
- PULLMAN G. S., BUCALO K., 2011: Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants, plant embryo culture: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, 710: 267–291.
- PULLMAN G. S., GUPTA P. K., TIMMIS R., CARPENTER C., KREITINGER M., WELTY E., 2005: Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Rep.*, 24 (5): 271–279.
- PULLMAN G. S., ZHANG Y., PHAN B. H., 2003: Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.*, 22 (2): 96–104.

- RAI M., VARMA A., 2010: *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. Springer-Verlag, Berlin, 459 s.
- SASA M., KROGSTRUP P., 1991: Ectomycorrhizal formation in plantlets derived from somatic embryos of Sitka spruce. *Scand. J. For. Res.*, 6: 129–136.
- SALAJ T., FRÁTEROVÁ L., CÁRACH M., SALAJ J., 2014: The effect of culture medium formulation on *Pinus nigra* somatic embryogenesis. *Dendrobiology*, 71: 119–128.
- SALAJ T., SALAJ J., 2003: Somatic embryo formation on mature *Abies alba* × *Abies cephalonica* zygotic embryo explants. *Biologia Plantarum*, 1: 7–11.
- SALAJOVA T., JASIK J., KORMUTAK A., SALAJ J., HAKMAN I., 1996: Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* × *Abies cephalonica*, and *Abies alba* × *Abies numidica*). *Plant Cell Reports*, 15 (7): 527–530.
- SCHULLER A., KIRCHNER-NEB R., REUTHER G., 2000: 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 (1): 23–31.
- SOUTHWORTH D., 2012: *Biocomplexity of plant-fungal interactions*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 220 s.
- STASOLLA C., KONG L., YEUNG E. C., THORPE T. A., 2002: Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell and Developmental Biology*, 38 (2): 93–105.
- ŠEBÁNEK J., 2004: *Harmonie v rostlinách: o botanické škole Rudolfa Dostála*. Vyd. 1. Academia, Praha, 175 s.
- STASOLLA C., YEUNG E. C., 2003: Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74 (1): 15–35.
- STRZELCZYK E., KAMPERT M., MICHALSKI L., 1985: Production of cytokinin-like substances by mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.) in culture with and without metabolites of Actinomycetes. *Acta Mikrobiologica Polonica*, 34 (2): 177–186.
- SZCZYGIEL K., KOWALCZYK J., 2001: Somatic embryogenesis of silver fir (*Abies alba* Mill.) – POLISH PROVENANCES (conference paper). *Acta Horticulturae*, 560: 509–512.

- TEIXEIRA DA SILVA J. A., MALABADI R. B., 2012: Factors affecting somatic embryogenesis in conifers. *Journal of Forestry Research*, 23 (4): 503–515.
- VAVŘIČKOVÁ M., 2008: *Vliv podmínek na desikaci zralých somatických embryí smrku*. Bakalářská práce, Brno, 48 s.
- VIKTOR NØRGAARD J., KROGSTRUP P., 1991: Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Cell Reports*, 9 (9): 509–513.
- VONDRÁKOVÁ Z., ELIÁŠOVÁ K., FISCHEROVÁ L., VÁGNER M., 2011: The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Cent. Eur. J. Biol.*, 6 (4): 587–596.
- VOOKOVÁ B., GAJDOŠOVÁ A., MATÚŠOVÁ R., 1997: Somatic embryogenesis in *Abies alba* × *Abies alba* and *Abies alba* × *Abies nordmanniana* hybrids. *Biologia Plantarum*, 40 (4): 523–530.
- VOOKOVÁ B., KORMUŤÁK A., 2001: Effect of sucrose concentration, charcoal and indole-3-butyric acid on germination of *Abies numidica* somatic embryos. *Biologia Plantarum*, 44 (2): 181–184.
- WANG W., PARK Y. S., RIDING R., BEARDMORE T., 2009: Norway spruce somatic embryogenesis: Improvement of somatic embryo maturation. *Propagation of Ornamental Plants*, 9 (4): 185–197.