



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

***In vitro* indukce haploidních, dihaploidních rostlin  
máku setého**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Klára Šanovcová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Klára Šanovcová
Název práce	<i>In vitro</i> indukce haploidních, dihaploidních rostlin máku setého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Mák setý ( <i>Papaver somniferum</i> L.) je významná olejnína používaná pro potravinářský a farmaceutický průmysl. Důležitý je jeho stabilní výnos a odolnost, proto je předmětem mnoha šlechtitelských programů. Jednou z možností, jak rychlým způsobem získat homozygotní linie je androgeneze. Principem je <i>in vitro</i> kultivace haploidních buněk, mikrospor. V rámci bakalářské práce byla testována metoda androgeneze u máku setého, vliv genotypu, složení indukčního a regeneračního média. Byla hodnocena indukce kalusu a regenerace rostlin. U regenerovaných rostlin byla následně stanovena ploidie pomocí průtokové cytometrie.
Klíčová slova	Mák setý ( <i>Papaver somniferum</i> L.), <i>in vitro</i> , androgeneze, ploidie
Počet stran	59
Počet příloh	2
Jazyk	český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Klára Šanovcová
Title of thesis	<i>In vitro</i> induction of haploid, dihaploid opium poppy plants
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	Opium poppy ( <i>Papaver somniferum</i> L.) is an important oilseed used in food and pharmaceutical industries. Its stable yield and resistance is important, that is why it is the subject of many breeding programs. One way to obtain homozygous lines quickly is by androgenesis. The principle is the <i>in vitro</i> cultivation of haploid cells, microspores. As part of the bachelor thesis, the method of androgenesis in opium poppy, the effect of genotype, the composition of induction and regeneration medium were tested. Callus induction and plant regeneration were evaluated. In regenerated plants ploidy level was detected by flow cytometry.
Keywords	Opium poppy ( <i>Papaver somniferum</i> L.), <i>in vitro</i> , androgenesis, ploidy level
Number of pages	59
Number of appendices	2
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 6.8.2021

.....

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat i Mgr. Karlu Doležalovi, DSc. za cenné rady, Mgr. Tomáši Vlčkovi, Ph.D. za pomoc při hledání odborné literatury a orientaci v laboratoři a Mgr. Otovi Blahouškovi za pořízení fotodokumentace.

# OBSAH

## SEZNAM ZKRATEK

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>11</b>
3.1	MÁK SETÝ .....	11
3.1.1	<i>Popis rostliny</i> .....	11
3.1.2	<i>Sledované parametry kvality</i> .....	12
3.1.3	<i>Odrůdy v České republice</i> .....	12
3.1.4	<i>Pěstební podmínky máku setého</i> .....	13
3.1.5	<i>Produkce a využití</i> .....	13
3.2	EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN .....	14
3.2.1	<i>Složení kultivačního média</i> .....	15
3.3	ANDROGENEZE .....	18
3.3.1	<i>Haploidní, dihaploidní rostliny</i> .....	19
3.3.2	<i>Faktory ovlivňující in vitro androgenezi</i> .....	20
3.3.3	<i>Identifikace haploidních a dihaploidních rostlin</i> .....	23
3.3.4	<i>Průtoková cytometrie</i> .....	23
3.4	ANDROGENEZE MÁKU SETÉHO .....	23
3.4.1	<i>Kultivace prašníků</i> .....	24
3.4.2	<i>Faktory ovlivňující in vitro androgenezi máku setého</i> .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>28</b>
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	28
4.1.1	<i>Odrůdy máku setého pěstované v polních podmínkách</i> .....	28
4.1.2	<i>Odrůdy a genotypy pěstované ve skleníku</i> .....	29
4.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	30
4.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	31
4.3.1	<i>Příprava médií</i> .....	31
4.4	METODY .....	31
4.4.1	<i>Odběr máku</i> .....	32
4.4.2	<i>Povrchová sterilizace poupat a izolace prašníků</i> .....	32
4.4.3	<i>Mikroskopické stanovení vývojové fáze mikrospor</i> .....	32
4.4.4	<i>Příprava kultivačních médií</i> .....	32
4.4.5	<i>Kultivace prašníků</i> .....	39
4.4.6	<i>Pasážování</i> .....	39

4.4.7	<i>Stanovení ploidie regenerovaných rostlin</i> .....	39
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>40</b>
5.1	STANOVENÍ VÝVOJOVÉ FÁZE MIKROSPORY V ZÁVISLOSTI NA VELIKOSTI POUPAT .....	40
5.1.1	<i>Stanovení vývojové fáze mikrospory</i> .....	40
5.1.2	<i>Optimální velikost poupat pro izolaci mikrospor</i> .....	41
5.2	STERILIZACE POUPĚTE.....	42
5.3	ANDROGENEZE MÁKU Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU PĚSTOVANÉHO V POLNÍCH PODMÍNKÁCH.....	42
5.3.1	<i>Indukce kalusů</i> .....	42
5.4	ANDROGENEZE MÁKU Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU PĚSTOVANÉHO VE SKLENÍKU .....	44
5.4.1	<i>Kultivace prašníků</i> .....	44
5.4.2	<i>Regenerace rostlin</i> .....	46
5.4.1	<i>Stanovení ploidie regenerovaných rostlin</i> .....	48
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>54</b>

## SEZNAM PŘÍLOH

*Příloha I: Tabulka 17: Donorové rostliny pěstované v polních podmínkách*

*Příloha II: Tabulka 18: Donorové rostliny pěstovány ve skleníku*

## Seznam zkratek

2,4-D	Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
BAP	6-benzylaminopurin
IAA	Kyselina indol-3-octová
IBA	Kyselina indol-3-máselná
iP	N6-isopentyladenin
KI	Kinetin
MS	Murashige a Skoog
NAA	Kyselina naftyloctová
PEO-IAA	Kyselina 2-(1H-indol-3-yl)-4-oxo-4-fenyl-máselná
ZR	Zeatin riboside



# 1 Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je velmi důležitou olejninou, která je pěstována převážně v České republice. Od roku 2006 je naše republika největším producentem a vývozcem máku na světě. Nejčastěji je mák využíván pro potravinářské účely, makovina je pak využívána ve farmaceutickém průmyslu. Vysoké požadavky jsou kladeny na nové odrůdy. Požadován je vysoký a stabilní výnos a odolnost vůči patogenům. Sledován je i obsah oleje a obsah látek v makovině. V procesu šlechtění je v současné době snaha využívat biotechnologické metody, mezi které patří *in vitro* kultivace haploidních buněk. Techniky gynogeneze a androgeneze nám umožňují tvorbu rostlin s gametickým počtem chromozomů.

Tento děj, gametická embryogeneze, je založený na změně vývoje z typického gametofytického ( $2n$ ) na sporofytický ( $n$ ) (Germanà, 2011b).

Gynogeneze je proces vzniku haploidních jedinců používaný u některých zemědělsky významných plodin jako je například cukrová řepa a cibule (Bohanec, 2008). Spočívá v *in vitro* kultivaci neoplodněných samičích gamet (Asif, 2013). Naopak u androgeneze dochází k *in vitro* kultivaci samčích gamet, mikrospor.

V dnešní době jsou metody androgeneze a gynogeneze zařazovány do šlechtitelských programů a hrají důležitou roli ve šlechtění hospodářsky významných plodin (Germanà, 2011a).

## 2 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
- Stanovit optimálního vývojového stádia mikrospor pro založení prašnickové kultury máku setého s cílem získat haploidní/dihaploidní rostliny.
- Určit nejvhodnější velikost a tvar poupat.
- Navrhnout vhodnou povrchovou sterilizaci poupat a optimální kultivační médium.
- U regenerovaných rostlin pomocí průtokové cytometrie stanovit ploidii, vyhodnotit vliv genotypu na indukci androgeneze.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Mák setý

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je hospodářsky důležitá olejnina patřící do čeledi makovité (*Papaveraceae*), rodu mák (*Papaver*). Čeleď zahrnuje zhruba 120 druhů, z toho na území České republiky jsou původní čtyři z nich. Je to rostlina jednoletá, diploidní ( $2n = 2x = 22$ ), avšak vyskytují se i jedinci tetraploidní ( $2n = 2x = 44$ ) (Bechyně a kol., 2001).

#### 3.1.1 Popis rostliny

**Vegetativní fáze** je charakteristická početnými, velkými, horizontálně rozloženými listy pilovitého tvaru.

**Reproduktivní fáze** se vyznačuje rozkvetlými květy a výskytem oválných povislých poupat (Bernath, 1999). Květy jsou oproti poupatům vztyčené, samostatně rostoucí s květním vzorcem  $K_2 C_2 + 2 A_\infty G(2-\infty)$  (Kapoor, 1995).

**Semeno** o velikosti 1,0–1,5 mm je ledvinovitého tvaru. Je náchylné k poškození, jelikož je měkké a jeho pětivrstvé osemení je velmi tenké a snadno propustné pro vodu. Povrch osemení tvoří šestiúhelníkové plošky ohraničené vystouplými žebry. Většinou platí pravidlo, že větší semena jsou kvalitnější než menší, což se projevuje při klíčení a počátečním růstu. Zralá semena jsou až z poloviny tvořena olejem, který obsahuje kyselinu stearovou, palmitovou, olejovou a linolovou.

**Klíčící rostlina** je charakteristická zahnutým hypokotylem, který se postupně narovná a je zakončen vidlicovitě rozevírajícími se děložními lístky. V této fázi je rostlina velice náchylná k vnějším vlivům.

**Kořenová soustava** je mělká, tvořena kulovým kořenem a dalšími menšími postranními kořeny.

**Lodyha máku** je rozdílná v závislosti na odrůdě a okolním prostředí. V našich podmínkách je většinou 0,6 až 2 m vysoká, 15 až 20 mm silná a větví se zhruba od 40 cm.

**Listy** jsou tmavě zelené pokryté voskovou vrstvičkou, která ovlivňuje funkci herbicidů.

**Květy** jsou rozděleny na dva zelené kališní lístky a čtyři velké korunní lístky, dva vnější a dva vnitřní. V květech se nachází velký počet tyčinek (100–250), které se skládají

z dlouhé tenké nitky nesoucí úzké prašníky béžové či nařialovělé barvy. Ty uvolňují pylová zrna 12 hodin před rozkvětem. Semeník je velký, kulovitěho tvaru, složen z 5–24 plodolistů, kdy každý vytváří jeden bliznový paprsek. Ve spodní části je zúžen v krček (gynofor).

**Tobolka** má různou velikost a tvar v závislosti na odrůdě a okolním prostředí. Pod každým paprskem blizny se nachází malé otvory. Pokud jsou téměř uzavřené, nazýváme je typ slepáky, a pokud jsou otevřené a může z nich vypadnout semeno, říká se jim typ hledáky. Počet lamel na makovici je identický s počtem paprsků blizny. Na křídélkách lamel se tvoří semena, která se při dozrání uvolňují a na jejich místech zůstávají tmavé skvrnky (Bechyně a kol., 2001).

### **3.1.2 Sledované parametry kvality**

Česká cechovní norma určuje kvalitu máku a jeho vhodnost pro potravinářské účely. Mák označený logem české cechovní normy garantuje český původ, splnění všech právních předpisů potřebných pro zaručení bezpečnosti potravin a vyloučení termostabilizace (Gabrovská, 2019). Pro mák splňující tyto parametry Česká cechovní norma vytvořila název „Český modrý mák“ (Mikšík, 2019).

Složení a senzorycké hodnocení jsou podle cechovní normy číslo 2019-01-14-0415 u nových odrůd vyžadovány a přísně hodnoceny.

Co se týče složení, je nutné, aby obsah morfinových alkaloidů byl nejvýše 20 mg/kg, příměsi a nečistoty nejvýše 8,0 % hmotnosti, olejnatost alespoň 40 %, přítomnost semen nevyzrálých a semen nebarevných, tmavých až černých maximálně 5 % a obsah poškozených semen nepřesahoval hodnotu 3 %. Je také důležité zaručit, aby mák neobsahoval škůdce a anorganické nečistoty.

Mezi senzorycké požadavky patří požadavky na vzhled, vůni, chuť a konzistenci. Semeno by mělo být modré, ledvinovité s šestiúhelníkovými ploškami na povrchu, vyzrálé a nepoškozené. Chuť a vůně typická pro mák, bez známek cizího pachu či výrazné kyselosti nebo hořkosti (Gabrovská, 2019).

### **3.1.3 Odrůdy v České republice**

V České republice se pěstují odrůdy, které jsou schváleny Českou cechovní normou a jednotně se označují jako Český modrý mák. Mezi tyto odrůdy patří: Akvarel,

Aplaus, Bergan, Gerlach, Major, Maratón, MS Harlekyn, Onyx, Opal, Opex, Orbis, Orfeus, Oz, Titan a Zeno Plus (Mikšík, 2019).

### **3.1.4 Pěstební podmínky máku setého**

Mák setý vyžaduje rovnoměrné zpracování půdy. Ideální jsou středně těžké, hluboké, hlinité až hlinitopísečné, dostatečně provzdušněné, nezaplevelené půdy s pH neutrálním až mírně zásaditým. Pro růst nové rostliny je omezující přítomnost půdního škraloupu, proto se mák nepěstuje na půdách se sklonem ke kornatění.

Na suchu se rostlina máku setého adaptuje růstem kořenu do větších hloubek. Nejvíce citlivá na nedostatek vody je v období prodlužovacího růstu. Vegetační doba máku setého je 120–140 dnů, během tohoto období rostlina jarního máku spotřebuje 250–350 l na m<sup>2</sup> u máku podzimního je spotřeba o 50 l vyšší.

Většina odrůd pěstovaných u nás je dlouhodobní, proto potřebují dostatek světla. Vůči chladu a mrazu jsou mladé rostliny odolné, ale odolnost s růstem klesá. Kritický limit se pohybuje okolo -7 až -8 °C (Kuchtová a kol., 2013).

### **3.1.5 Produkce a využití**

Celoroční domácí spotřeba máku setého se pohybuje okolo tří tisíc tun semen. Největším evropským producentem máku setého pro potravinářské účely je právě Česká republika. Problémem však je, že výnos máku setého je nestálý a ze známých odrůd je pouze pár vhodných do pěstebních podmínek České republiky (Klíma a kol., 2014a).

Mák setý je také pěstován pro svá semena, ze kterých je vyráběn olej. Pro farmakologické potřeby jsou z rostlin získávány alkaloidy obsažené v opiu jako například morfin, kodein, narcotin, papaverin nebo thebain (Labanca a kol., 2018).

Dle informací z Českého statistického úřadu produkce máku v České republice od roku 2018 výrazně stoupá. Plocha, výnos a sklizeň máku setého v jednotlivých krajích v letech 2018–2020 jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Plocha, výnos a sklizeň máku setého v jednotlivých krajích ČR v roce 2018, 2019 a 2020. Převzato: <https://www.czso.cz/csu/czso/statistiky>

Rok	Plocha v hektarech	Výnos v t/ha	Sklizeň v tunách	Plocha v hektarech	Výnos v t/ha	Sklizeň v tunách	Plocha v hektarech	Výnos v t/ha	Sklizeň v tunách
	2018			2019			2020		
<b>Česká republika</b>	<b>26 608</b>	<b>0,52</b>	<b>13 778</b>	<b>35 778</b>	<b>0,68</b>	<b>24 190</b>	<b>40 255</b>	<b>0,73</b>	<b>29 326</b>
Hl. m. Praha	322	0,45	146	200	0,60	121	457	0,63	286
Středočeský	5 160	0,50	2 581	6 145	0,66	4 031	7 330	0,69	5 078
Jihočeský	1 486	0,58	867	2 139	0,73	1 559	2 377	0,85	2 019
Plzeňský	1 210	0,59	710	1 412	0,73	1 036	1 509	0,84	1 270
Karlovarský	37	0,60	22	48	0,75	36	177	0,90	160
Ústecký	962	0,44	427	1 347	0,62	830	1 390	0,64	885
Liberecký	597	0,57	339	502	0,70	352	560	0,79	444
Královéhradecký	2 605	0,47	1 215	3 147	0,63	1 998	3 409	0,67	2 289
Pardubický	2 443	0,54	1 328	3 312	0,70	2 304	3 833	0,77	2 956
Vysočina	4 280	0,59	2 538	5 644	0,74	4 155	6 117	0,86	5 270
Jihomoravský	1 546	0,41	631	3 283	0,65	2 128	3 764	0,61	2 307
Olomoucký	2 924	0,49	1 421	4 566	0,64	2 939	5 145	0,67	3 466
Zlínský	663	0,43	287	1 307	0,63	818	929	0,62	573
Moravskoslezský	2 376	0,53	1 266	2 725	0,69	1 883	3 257	0,71	2 324

### 3.2 Explantátové kultury rostlin

Rostlinné explantáty jsou asepticky kultivované izolované rostlinné orgány, nebo buňky pěstované v *in vitro* podmínkách na kultivačních médiích. Metody explantátových kultur mohou být používány jako doplňkové postupy při šlechtění některých hospodářsky významných plodin. Je využíváno totipotence, schopnosti buněk organismu vytvářet rostliny s kompletní genetickou informací. Za určitých podmínek mohou být z kultivovaných explantátů dopěstovány rostliny.

Úspěšnost kultivace je ovlivněna mnoha faktory, především je to typ kultivovaného explantátu a kultivační podmínky. Velmi záleží na tom, z kterého orgánu je explantát izolován, na vývojovém stádiu rostliny, na zdravotním stavu rostliny, na velikosti a stáří explantátu, na genotypu a také na orientaci explantátu na médiu.

Podle charakteru nově vznikajících struktur na kultivačním médiu rozlišujeme organogenezi a embryogenezi, somatickou a pylovou. V závislosti na druhu a genotypu rostliny můžeme kultivovat jednotlivé její části: izolované meristémy, zygotická embrya,

mikrospory, protoplasty. Explantátové kultury se využívají například pro mikropropagaci, pro získání haploidních, dihaploidních rostlin, při vzdálené hybridizaci, v procesu transgenozie. Růst a vývoj explantátových kultur také ovlivňují kultivační podmínky. Důležité je složení kultivačního média a podmínky kultivace, světelný režim, intenzita osvětlení a teplota při kultivaci.

Podle části rostliny, která je kultivována, lze rozdělit explantátové kultury na (Pierik, 1997):

- Kultura intaktních rostlin – kultura *in vitro*, kdy rostlina roste ze semene, například orchideje.
- Kalusová kultura – kultura z nediferenciovaného pletiva, kalusu.
- Buněčná kultura – kultury vzniklé z jednotlivých buněk získaných z pletiva nebo kalusu, u kterých je růst podporován enzymaticky.
- Orgánová kultura – vzniká izolováním orgánů, které následně rostou v *in vitro* podmínkách. Orgánové kultury lze dále dělit na meristémové, kořenové, prašníkové atd.
- Kultura protoplastů – získávána enzymatickým štěpením buněčných stěn kultivovaných buněk.
- Embryonální kultura – je izolováno embryo, které dále roste poté, co jsou odebrány semenné obaly.

### 3.2.1 Složení kultivačního média

Významný vliv na růst *in vitro* kultur má složení kultivačního média. Médium obsahuje anorganické a organické sloučeniny, zdroje organického uhlíku (mono-, disacharidů) a růstových regulátorů. Média mohou být tekutá, nebo bývají ztužena agarem, případně jiným typem ztužovací složky. Anorganické sloučeniny, makroelementy a mikroelementy, jsou dodávány ve formě solí. Podle typu média jsou přidávány organické sloučeniny: vitamíny, aminokyseliny, inositol, mohou být přidávány i přírodní rostlinné látky, například kokosové mléko. Jako zdroj uhlíku je do média přidávána v různých koncentracích sacharóza, nebo maltóza, případně glukóza. Důležitou složkou kultivačních médií jsou růstové hormony: auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, které v určitých koncentracích, nebo kombinacích ovlivňují růst explantátů.

Existuje velké množství komerčně vyráběných kultivačních médií, nebo jejich modifikací, které jsou určeny pro různé typy explantátových kultur. Kultivační médium Murashige a Skoog (MS), je svým složením jedním z nejpoužívanějších médií (Murashige a Skoog, 1962). Růst a vývoj explantátů je také ovlivněn pH, doporučená hodnota pH média je 5,4–5,8 (Saad a Elshahed, 2012).

- Chemické prvky v kultivačních médiích

Nejvýraznější vliv na efektivní vývin rostlin má 19 základních prvků. Ty jsou rozděleny do tří skupin podle potřeby rostlin na základní prvky (C, H, O), makroprvky (N, P, S, K, Mg, Ca) a mikroprvky (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Mo, Cl, B, Ni, Al). Makroprvky jsou přidávány do média ve větších koncentracích než mikroprvky. Nedostatečné množství jakéhokoli prvku může mít negativní vliv na růst a vývoj rostliny. Hranice minimální koncentrace je specifická pro každý rostlinný druh.

Organický uhlík je do médií přidáván ve formě cukrů. Nejčastěji to je sacharóza díky její ceně, stabilitě při sterilizaci média v horkovzdušném sterilizátoru a snadné asimilaci s rostlinami. Mezi další, často používané cukry patří například glukóza, fruktóza. (Kumar a kol., 2016).

- Vitamíny a myo-inositol

Rostliny mají schopnost biosyntézy vitamínů potřebných pro jejich růst. Ta ale klesá v části rostliny, která je oddělena od celku. Vitamíny musí být přidávány do živných médií, jelikož jsou důležité pro metabolismus a fyziologii rostlinných buněk (Kumar a kol., 2016).

Mezi životu limitující vitamíny patří thiamin (vitamín B1), pro zlepšení růstu je vhodné přidat kyselinu nikotinovou a pyridoxinu (vitamín B6). Některá média obsahují například i panthotenát, kyselinu listovou, kyselinu askorbovou a biotin, které ale nepatří mezi životně důležité vitamíny (Saad a Elshahed, 2012)

Thiamin je přidáván v koncentracích 0,1–10 mg/l, kyselina nikotinová 0,1–5 mg/l a pyridoxin 0,1–10 mg/l (Saad a Elshahed, 2012).



Často používané je MS médium, které obsahuje 0,1 mg/l thiaminu, 0,5 mg/l kyseliny nikotinové, 0,5 mg/l pyridoxinu a 100 mg/l myo-inositolu (Murashige a Skoog, 1962).

- Aminokyseliny

Nejvíce zastoupenou aminokyselinou ve většině médií je glycin. Aminokyseliny jsou zdrojem organického dusíku pro rostliny. Další aminokyseliny, prospívající růstu a embryogenezi, jsou například glutamin, arginin, methionin, asparagin, kyselina asparagová a prolin (Kumar a kol., 2016).

- Ztužovací složky

Živná média mohou být tekutá, nebo po přidání želatinačního činidla, ztužená. Nejčastěji používanou složkou je agar, což je polysacharid, který pochází z mořských řas. Jeho správná funkce v médiích závisí na pH, teplotě a jeho koncentraci, nejčastěji 8,0 g/l. Agar však pH média neovlivňuje a je relativně inertní (Kumar a kol., 2016).

Mezi další želatinační složky patří gellanová guma, komerčně známá jako Gel-Gro®, Gerlite® (Kelco, Merck) and Phyta-gel® (Sigma). Gellanová guma je polysacharid produkovaný bakteriemi. V porovnání s agarem je používána v menším množství, pro explantátové kultury je používána v rozmezí 1,5–3,5 g/l. Její častější využití je omezeno vyšší cenou. Mezi další, méně používané, želatinační složky patří například alginát vápenatý, guarová guma, xantanová guma a další (Lima a kol., 2012).

- Růstové regulátory, fytohormony

Fytohormony jsou látky podílející se na růstu a vývoji rostlin. Růst *in vitro* kultur neovlivňuje pouze koncentrace fytohormonů, často i jejich kombinace a poměr. Růstové hormony jsou rozděleny do skupin:

**Auxiny** jsou rostlinné hormony, které zapříčiňují růst buněk do délky. V *in vitro* kulturách jsou auxiny využívány pro indukci růstu buněk a kalusů, nebo k stimulaci růstu apikálních meristémů. Transport auxinů je zajištěn protonovými pumpami (auxiny získají negativní náboj) za spotřeby ATP.

Různé druhy auxinů se projevují různou fyziologickou aktivitou. Jsou jinak metabolizovány, váží se na jiné receptorové buňky.

Hlavním zástupcem, který se vyskytuje v přírodě, je kyselina indol-3-octová (IAA), která je derivátem tryptofanu. Mezi další zástupce auxinů patří kyselina 1-naftyloctová (NAA), kyselina indol-3-máselná (IBA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D). IBA a NAA vyvolávají růst kořenů a ve spolupráci s cytokininy růst výhonků, 2,4-D indukuje růst kalusů.

**Cytokininy** jsou N6-deriváty adeninu. Po přidání cytokininů do média dochází k buněčnému dělení a diferenciaci výhonků. V rostlinách se vyskytují v kořenech. Mezi hlavní zástupce patří 6-benzylaminopurin (BAP), 6- $\beta$ - $\beta$ -dimethylaminopurin (2-iP), N-(2-furfurylamino)-1-purin-6-amin (Kinetin) a 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butylaminopurin (Zeatin). V rostlinných kulturách je velmi důležitý poměr auxinů k cytokininům. Pokud je obsah cytokininů vysoký, dochází k embryogenezi, iniciaci kalusu a růstu kořenů.

**Gibereliny** jsou rostlinné hormony produkované v kořenech a mladých listech. Jsou používány za účelem regenerace a prodloužení rostliny. Existuje více než 100 zástupců, nejznámějším je GA3, který indukuje růst buněk.

**Kyselina abscisová (ABA)** je rostlinný hormon, který inhibuje růst rostliny v období, kdy je ve stresových podmínkách. Lze ji považovat za antagonistu předešlých hormonů (Sathyanarayana a Mathews, 2007).

### 3.3 Androgeneze

Androgeneze je *in vitro* metoda, kdy ze samčích pohlavních buněk, mikrospor, které mají haploidní chromozomovou výbavu, regenerují haploidní nebo dihaploidní rostliny (Murovec a Bohanec, 2012; Bhojwani a Dantu, 2013).

Metoda je založena na schopnosti nezralých pylových zrn změnit způsob vývoje z gametofytu na sporofyt, kdy dochází k buněčnému dělení na haploidní úrovni a k následném vzniku kalusů nebo pylových embryí (Murovec a Bohanec, 2012). Indukce sporofytu je možná pouze v raných vývojových stádiích mikrospory (Touraev a kol., 2001).

Výsledkem této metody jsou homozygotní linie, které vznikají z heterozygotních rodičů pouze během jedné generace. Tento proces umožňuje rychlou a přímou tvorbu liniových odrůd o přesně známých a potřebných parametrech výkonu a kvality (Klíma a kol., 2014a).

Efektivita androgeneze může být zvyšována působením stresových faktorů na rostlinu, jako například teplota (chlad, zvýšená teplota) a osmotický stres (Bhojwani a Dantu, 2013).

Metoda androgeneze je využívána ve šlechtění rostlin s výhodnými vlastnostmi k rychlému získání homozygotních rostlin. Androgeneze prašnickových kultur je používána u více než 200 rostlinných druhů (Bhojwani a Razdan, 1996).

### **3.3.1 Haploidní, dihaploidní rostliny**

Haploidní rostliny jsou rostliny obsahující gametický počet chromozomů ( $n$ ). Jsou dva způsoby vzniku haploidů, a to gynogeneze a androgeneze. Pro vznik haploidů je androgeneze metodou používanější a efektivnější.

Vznik haploidních rostlin v přírodě může být spontánní, frekvence tohoto jevu je však nízká ( $10^{-3}$ – $10^{-6}$ ). Pro vznik haploidů se využívají experimentální metody, nejčastěji jsou mikrospory kultivovány v *in vitro* podmínkách.

Haploidní rostliny ( $n = x$ ), oproti rostlinám diploidním ( $2n = 2x$ ) vykazují změny v počtu chromozomů v buňkách. Jedná se o změny na úrovni celých chromozomových sad, rostliny haploidní, nebo jen části chromozomů, rostliny aneuhaploidní. Haploidní rostliny jsou dále rozdělovány na monohaploidní ( $2n = x$ ), dihaploidní ( $2n = 2x$ ), trihaploidní ( $2n = 3x$ ), atd. (Asif, 2013).

Fenotyp haploidních rostlin v porovnání s diploidními rostlinami je menšího vzrůstu a vyznačuje se nižší vitalitou. Rostliny jsou sterilní, sterilita těchto rostlin je způsobená neschopností párování chromozomů během meiózy. Pro jejich fertilitu je potřeba zdvojení chromozomů (Murovec a Bohanec, 2012).

V procesu androgeneze mohou vznikat i mixoploidní rostliny, nazývané chiméry. Ve vícejaderných mikrosporách dochází k fúzi dvou a více dceřiných jader, které tvoří mixoploidní embryo (Mohan-Jain a Bhalla-Sarin., 2013).

Dihaploidní rostliny vznikají z haploidních rostlin chromozomovou duplikací. Mohou vznikat spontánně, nebo je prováděno zdvojení chromozomů pomocí chemických

látek, které jsou přidávány do kultivačních médií, nebo jsou aplikovány na mladé rostliny. Princip chromozomové duplikace spočívá v narušení průběhu mitózy mezi S fází a cytokinezí. Indukce *in vitro* chromozomové duplikace je prováděna pomocí antimitotických činidel, jako je například oryzalin, kolchicin a trifuralin. Chromozomová duplikace je ovlivněna složením média, antimitotickými činidly, druhem explantátu, době expozice a koncentrací (Dhooghe a kol., 2011).

### **3.3.2 Faktory ovlivňující *in vitro* androgenezi**

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují proces androgeneze. Jsou odlišné v závislosti na druhu rostliny, dokonce se mohou lišit u organismů stejného druhu, ale odlišného genotypu (Bhojwani a Dantu, 2013).

Nejčastěji jsou tyto faktory zkoumány na obilovinách jako je například ječmen nebo pšenice. Je to proto, že u těchto rostlinných druhů je androgeneze prováděna nejčastěji a je nejvíce prozkoumaná.

Mezi faktory, které ovlivňují efektivitu androgeneze patří genotyp, fyziologický stav donorové rostliny, stádium vývoje mikrospor, správné zacházení při zakládání kultury. Důležitým faktorem je médium, na kterém explantáty kultivujeme (Bhojwani a Dantu, 2013).

#### **3.3.2.1 Genotyp**

Důležitým faktorem ovlivňujícím úspěšnost androgeneze je genotyp. Zatímco u některých rostlin lze snadno získat velké množství pylových embryí, u jiných kultivarů je to prakticky nemožné.

Byla vydána publikace zabývající se vlivem genotypu na efektivitu androgeneze u ječmene. Kahrizi a kol. (2011) zkoumali androgenezi 12 genotypů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) pěstovaného ve skleníku. Zjistili, že u dvou genotypů je mnohem vyšší indukce kalusů než u ostatních genotypů. Jednalo se o genotyp No. 9 (74,8 %) a No.7 (62,9 %). Naopak u genotypů No.1, No.6 a No.11 byla tvorba kalusů v prašnickové kultuře nízká (5,4 %, 3,8 % a 5,6 %). Podobné výsledky byly dosaženy i u regenerace rostlin. Nejvyšší regenerace byla pozorována u genotypu No. 9 (7,3 %) a nejnižší u genotypů No.1 (0,4 %), No.6 (0,6 %) a No.11 (0,4 %).

### 3.3.2.2 Donorové rostliny

Velký vliv na androgenezi má stáří, fyziologický stav donorové rostliny, ze které jsou prašníky odebírány. U většiny druhů rostlin jsou prašníky z prvních klasů nebo poupat považovány za nejvhodnější, jsou dobře vyvinuty, s dostatkem kvalitních prašníků (Bhojwani a Razdan, 1996). Závisí také na pěstebních podmínkách, ve kterých donorová rostlina roste. Indukce kalusů a množství regenerovaných rostlin může být ovlivněno výživou, intenzitou světla, fotoperiodou a teplotou během růstu donorových rostlin (Trigiano a Gray, 1999).

Bylo zjištěno, že donorové rostliny pěstované v řízených podmínkách skleníku poskytují lepší embryogenní odpověď než rostliny pěstované na poli (Asif, 2013).

### 3.3.2.3 Vývojové stádium mikrospor

Zásadní vliv na efektivitu androgeneze má vývojové stádium mikrospor. Pro většinu druhů rostlin pro kultivaci v *in vitro* podmínkách je optimální rané nebo středně jednojaderné stádium (Trigiano a Gray, 1999).

Například u prašníků kukuřice je vhodné stádium mikrospor pozdně jednojaderné až časně dvojjaderné. Také u dvouděložných rostlin je jednojaderné a časně dvojjaderné stádium mikrospory vhodné pro pylovou embryogenezi (například brukev řepka) (Datta, 2005).

Stanovení vhodného stádia mikrospory lze provádět světelným mikroskopem. Prašníky jsou roztlačeny a mikrospory jsou barvené acetokarmínem nebo acetoorceinem. Při zvětšení 200x je stádium mikrospory dobře viditelné.

### 3.3.2.4 Kultivační médium

Složení kultivačního média hraje důležitou roli ve výživě mikrospor, ale také může určit způsob vývoje embrya. Jak již bylo uvedeno, často je používáno MS médium (Murashige a Skoog, 1962), N6 médium (Chu, 1981), nebo jejich modifikace. Bylo zjištěno, že dusíkaté látky hrají významnou roli v indukci androgeneze. U mnoha obilnin způsobuje zvýšení množství glutaminu a snížení množství dusičnanu amonného zlepšení embryonálního vývoje. U pšenice je žádoucí vyšší koncentrace sacharózy v médiu. Také použití maltózy místo sacharózy u obilnin zlepšuje indukci kalusů a regeneraci rostlin. Obohacením média kyselinou abscisovou, nebo použitím extraktu z brambor může vést ke

zlepšení úspěšnosti androgeneze u rýže. Významnou roli na embryonální vývoj mikrospor hraje i osmotický tlak média (Datta, 2005).

#### 3.3.2.5 Předpůsobení

Předpůsobení prašníků je jedním z dalších faktorů ovlivňující androgenezi. Mikrospory jsou geneticky předurčeny ke gametofytickému vývoji. Mechanismus, kterým mikrospory změni svůj vývoj z gametofytického na sporofytický není zatím úplně objasněn. Vhodné předpůsobení, navození stresových podmínek je v mnoha případech účinné pro navození indukce kalusů a regenerace rostlin (Tyankova a Zagorska, 2008). Jednou, často používanou metodou je předpůsobení chladem. Na a kol. (2011) testovali vliv chladového předpůsobení (v teplotě 4 °C, po dobu: 0, 24, 48, 72, 96, 120, a 144 hodin) na indukci kalusů u jahodníku. Bylo zjištěno, že došlo ke zlepšení indukce a kvality kalusů, které byly ovlivněny po dobu 72 hodin před kultivací. Kiviharju a Pehu (1998) testovali působení chladu a tepelného šoku na prašníky ovsa setého. Předpůsobení chladem (7 dní v teplotě 4 °C) zvýšilo indukci kalusů a předpůsobení teplem (32 °C ve tmě, po dobu 0, 1, 3, 5 nebo 7 dní) iniciovalo vznik embryonálních struktur.

Mezi další používané metody předpůsobení a spouštěče indukce embryogeneze patří například: osmotický stres, chemický stres, metabolické hladovění.

#### 3.3.2.6 Albinismus

Jako albinismus je označována neschopnost rostlin tvořit funkční chloroplasty a s tím spojená neschopnost fotosyntézy. Rostliny s nedostatkem chlorofylu dosahují při kultivaci v *in vitro* podmínkách pouze raného stádia vývoje (Makowska a Oleszczuk, 2014). Albikátní rostliny vznikají procesem androgeneze v různém poměru, v závislosti na kultivaru. Albinismus u ječmene může výrazně snížit počet dihaploidních rostlin. Poměr vzniku albikátních rostlin je odlišný u různých genotypů. U některého z genotypů může být výskyt albikátních rostlin kolem 1 %, ale u některých genotypů může být většina regenerovaných rostlin albikátních, až 99,7 % (Ohnoutková a kol., 2019).

### **3.3.3 Identifikace haploidních a dihaploidních rostlin**

U regenerovaných rostlin je velmi důležité zjistit ploidii, zda se jedná o haploidní nebo dihaploidní, případně mixoploidní rostlinu.

Ploidii můžeme zjistit několika způsoby: a) cytologicky, podle počtu chromozomů, metoda je však velmi náročná na provedení; b) metodou, která je založena na porovnání regenerovaných rostlin s rostlinou donorovou, a to jak makroskopicky (například podle morfologie, vitality a fertility), tak mikroskopicky (například podle počtu a velikosti chloroplastů); c) nejspolehlivější a nejefektivnější metodou je průtoková cytometrie, měřen je obsah jaderné DNA (Murovec a Bohanec, 2012).

### **3.3.4 Průtoková cytometrie**

Principem průtokové cytometrie je měření buněčného signálu, který prochází detektorem. Je důležité zvolit vhodný fluorescenčně značený antigen, který je specifický pro povrch zkoumané buňky, díky tomu jsou selektovány buňky našeho zájmu. Fluorescenčně chemická vazba k antigenu je zvolena na základě vlnové délky laseru, který je přítomen v průtokovém cytometru. Průchozí světlo o typické vlnové délce je detekováno optickým systémem, který je citlivý právě na danou vlnovou délku. Informace jsou poté shromažďovány a zpracovány speciálním softwarem (Jahan-Tigh a kol., 2012).

## **3.4 Androgeneze máku setého**

Androgeneze je metoda, kdy z heterozygotních rostlin vznikají kompletně homozygotní linie během jedné generace. Androgeneze máku setého je popsána pouze v jedné publikaci z roku 1988 (Dieu a Dunwell, 1988) a v metodice Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., která byla publikována v roce 2014 (Klíma a kol., 2014a). Informace publikované v metodice jsou shrnuty v časopise Úroda (Klíma a kol., 2014b). V obou případech jsou odebrané prašníky kultivovány nejprve na indukčním médiu, po vzniku kalusů jsou kalusy postupně přeneseny na regenerační médium. Ve fázi 3–5 listů jsou rostliny přeneseny na médium s růstovým regulátorem indukujícím tvorbu kořenového systému.

### 3.4.1 Kultivace prašníků

Založení prašnickové kultury máku setého zahrnuje několik kroků. Nejdříve je odebráno poupě obsahující prašníky s mikrosporami ve vhodném stádiu. Poupata jsou následně sterilizována a poté jsou z nich v aseptických podmínkách extirpovány prašníky a ihned jsou přeneseny na tuhé indukční médium. Indukované kalusy jsou postupně pasážovány na regenerační a zakořeňovací média.

Dieu a Dunwell (1988) ve své práci testovali různé genotypy máku setého. U 16 genotypů máku setého hodnotili indukci kalusů, regeneraci rostlin a jejich ploidii v závislosti na chladovém předpůsobení. Donorové rostliny byly pěstovány v růstové komoře v řízených podmínkách (pěstební podmínky: 35 dní 15 °C, fotoperioda 12 hodin, intenzita osvětlení 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  nebo 240  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Po jednom měsíci byla polovina donorových rostlin přenesena na pole, u druhé poloviny rostlin, která byla kultivována v růstové komoře, byly změněny kultivační podmínky (teplota 25 °C, fotoperioda 16 hodin, intenzita osvětlení 240  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Z odebraných pupat byly vypreparovány prašníky, které byly vloženy do Petriho misky a ponechány 2 nebo 7 dní ve tmě v chladu při 7 °C. Po chladovém předpůsobení byly prašníky kultivovány na dvou rozdílných indukčních médiích (25 °C, tma). Vzniklé kalusy byly přeneseny na regenerační médium a kultivovány v kultivační komoře (20 °C, intenzita osvětlení 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Regenerované, mladé rostliny byly pasážovány na médium bez hormonů, kultivovány byly v kultivační komoře (15 °C, fotoperioda 12 hodin, intenzita osvětlení 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Dobře vyvinuté, zakořeněné rostliny byly přesazeny do zahradního substrátu a dopěstovány ve skleníku. U všech rostlin byla cytologicky stanovena ploidie.

Klíma a kol. (2014a) ve své metodice popisují postup vzniku homozygotních linií máku setého, ozimého a jarního typu F<sub>1</sub> hybridů. Donorové rostliny byly pěstovány v různých pěstebních podmínkách, podle čtyř základních schémat:

a) pěstování donorových rostlin v řízených podmínkách v rašelinovém substrátu, což umožňovalo celoroční odběry explantátů (teplota den/noc 15/12 °C, fotoperioda 9/15 hodin, intenzita osvětlení 180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Ve fázi 2–3 listů byly rostliny rozděleny na pět rostlin, ve fázi šesti listů na tři rostliny a přihnojeny tekutým plným hnojivem. U ozimého máku byla provedena jarovizace po dobu dvou měsíců (teplota 2–5 °C, fotoperioda 8/16 hodin). Po vzniku 8 pravých listů byly rostliny přeneseny do rašelinového substrátu a každých 14 dní přihnojovány. Ve fázi 12–14 listů byly rostliny



přesazeny a pěstovány do kultivační komory (teplota den 18–22 °C, noc 12–14 °C, fotoperioda 16/8 hodin, intenzita osvětlení 220  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), každých 14 dní byly rostliny přihnojovány;

b) pěstování ozimých donorových rostlin ve skleníku, explantáty byly odebrány na jaře. V období prosinec–leden byly rostliny odebrány z pole a pěstovány ve skleníku (10–15 °C, bez přisvětlování).

c) pěstování donorových rostlin ve skleníku, odběr explantátů v jarním a podzimním období. Pro jarní odběry byl mák vyset do fytotronu nebo skleníku na začátku ledna, pro podzimní odběry byl vysetý mák umístěn do kompletně řízených podmínek.

d) Pěstování donorových rostlin v polních podmínkách, sadby pro časně letní odběry explantátů. Mořené osivo bylo vyseto na pole, důležité bylo protrhávání porostů, ošetření proti chorobám a škůdcům a plečkování. Odebírána byla uzavřená poupata, jejichž délka stopky činila alespoň 5 mm a poupě s ní svíralo úhel 0–120°. Povrchová sterilizace byla prováděna 70% ethanolem (v/v). Po oschnutí byly asepticky vypreparovány prašníky a bylo u nich stanoveno vývojové stádium mikrospor. Stanovení bylo provedeno nepřímo, dle rozdílu délek okvětních plátků a semeníků (1–10 mm), nebo přímo, mikroskopicky dle velikosti vakuoly (středně jednojaderné stádium se vyznačuje vakuolou vyplňující přes 50 % objemu mikrospory). Byla založena prašnicková kultura na tuhém indukčním médiu (8 ks/Ø 60 mm nebo 20 ks/Ø 90 mm). Kultury byly umístěny do termostatu (tma, 35 °C po dobu 24 hodin, poté snížení teploty na 25 °C). Po vzniku embryonálních struktur byly kalusy pasážovány na regenerační médium a po vzniku prýtlů byly kultury přeneseny z termostatu do růstové komory (teplota 25 °C, fotoperioda 16/8 hodin, intenzita osvětlení 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Po zezelenání prýtlů byly změněny kultivační podmínky (teplota 18±2 °C, fotoperioda 9/15 hodin, intenzita osvětlení 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Ve fázi 3–5 listů byly rostliny přeneseny na médium bez hormonů (4–6 ks/100 ml Erlenmeyerova baňka) a po vzniku listové růžice pasážovány na zakořeňovací médium. Dobře vyvinuté rostliny byly přesazeny do Perlitu, umístěny do nesterilních podmínek a ošetřeny fungicidem (propamocarb). Květníky s rostlinami byly zakryty perforovanou fólií (20 dní, poté byla odstraněna) a uloženy do kultivační komory (teplota ± 18 °C, intenzita osvětlení 80–100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , hnojení každých 14 dní). Po prokořenění byly rostliny přesazeny do rašelinného substrátu. Před začátkem kvetení byla hodnocena uniformita.

Regenerace celistvých rostlin máku setého v *in vitro* kulturách byla testována a publikována v časopise Úroda (Klíma a kol., (2014b). Byly použity kalusy z prašnickových kultur, dvou genotypů jarního typu (24/6, OPP10 a OPP13) a jeden genotyp ozimého typu máku. Byly testovány tři varianty regeneračního a zakořeňovacího média. Každý kalus byl pinzetami rozdělen na menší části ( $8 \pm 2$  mm), položen na povrch regeneračního média a kultivován v termostatu (tma, 25 °C). Po vzniku prýtlů byly kultury přeneseny do kultivační komory (teplota 25 °C, fotoperioda 16/8 hodin, intenzita osvětlení 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Jakmile prýty zezelenaly, byly změněny pěstební podmínky (teplota  $18 \pm 2$  °C, fotoperioda 9/15 hodin, intenzita osvětlení 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Ve fázi 3–5 listů byly rostliny přeneseny na zakořeňovací médium. Bylo testováno od každé varianty médií 20 vzorků (prýtlů) ve třech biologických opakováních.

### **3.4.2 Faktory ovlivňující *in vitro* androgenezi máku setého**

#### **3.4.2.1 Vývojová fáze mikrospor**

Při androgenezi máku setého jsou optimální mikrospory ve vývojové fázi středně jednojaderné či časně dvojjaderné (Obr. 2) (Klíma a kol., 2014a). Charakteristické pro pozdně jednojaderné stádium je uložení jádra blízko buněčné stěny a velká vakuola vyplňující více než polovinu buněčného prostoru. Avšak v jednom poupěti se mohou nacházet prašníky obsahující mikrospory v různých vývojových stádiích (Dieu a Dunwell, 1988). Pro kontrolu stádia mikroskopováním je nutné připravit roztakový preparát a také přidat vhodné barvivo (například acetokarmín). Poté je možné sledovat vývojové stádium při zvětšení 400–600x (Klíma a kol., 2014a).

#### **3.4.2.2 Kultivační médium pro produkci homozygotních linií máku**

Během androgeneze je používáno několik typů kultivačních médií:

##### **a) Indukční médium**

Dieu a Dunwell (1988) doporučuje pro indukci kalusů médium A19, které obsahuje 30 g/l sacharózy, 8 g/l agaru, 2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l IAA, 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l Kinetinu, hodnota pH 5,8–6,0.

Klíma a kol. (2014b) indukovali kalus u tří genotypů máku na stejném médiu.

b) Regenerační médium

Pro regeneraci bylo použito v obou publikacích regenerační médium R, které obsahuje 2 % sacharózy, 0,1 mg/l BAP a 0,5 mg/l KI. Pro urychlení regenerace bylo použito i médium bez hormonů. Z 367 získaných kalusů regenerovalo 140 rostlin, přičemž z některých kalusů regenerovalo rostlin více (Dieu a Dunwell, 1988).

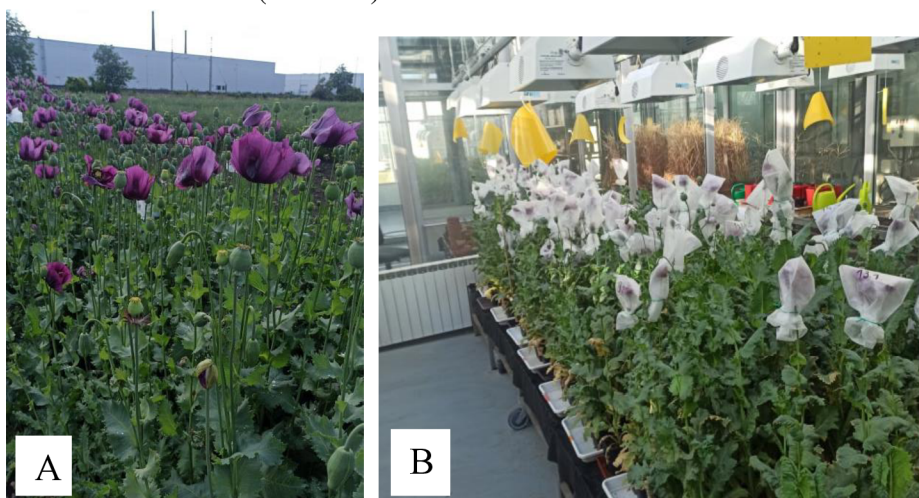
Regenerace rostlin u máku je považována za nejkritičtější fázi *in vitro* androgeneze (Klíma a kol., 2014a).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Pro indukci androgeneze byly rostliny máku setého pěstovány v rozdílných pěstebních podmínkách:

- v polních podmínkách (Obr.1 A)
- ve skleníku (Obr.1 B)



Obrázek 1: Rostlinný materiál. A – rostliny máku setého pěstované na poli; B – rostliny máku setého pěstované ve skleníku. Foto autor.

#### 4.1.1 Odrůdy máku setého pěstované v polních podmínkách

Tři odrůdy máku setého, ze kterých se odebírala poupata byly vysety 24. 9. 2019 na pozemku UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, na parcele 1721/9.

**Oz** patří mezi ozimé, středně rané, modrosemenné odrůdy typu slepák. Jedná se o odrůdu středně odolnou proti napadení pleosporovou hnědou skvrnitostí máku v tobolkách, středně odolnou proti plísním. Rostlina je středně vysoká s nízkým výskytem hledáků a středně vysokým až vysokým počtem tobolek. Využití je převážně v potravinářském průmyslu, výnos semen je vysoký. Semena obsahují vysoké množství oleje a nízké množství morfinu (UKZÚZ, 2017).

**Titan** patří mezi ozimé odrůdy máku typu slepák, která je polopozdní modrosemenná. Je méně až středně odolný proti napadení pleosporovou hnědou skvrnitostí máku v tobolkách a středně odolný proti plísním. Rostlina máku je vysoká, se středně velkým počtem tobolek a nízkým až středně vysokým výskytem hledáků.

Využívá se nejčastěji pro potravinářské účely. Obsah oleje v semenech vysoký, morfinu nízký (UKZÚZ, 2019).

**Zeno Plus** je ozimá, středně raná, modrosemenná odrůda typu slepák. Je méně odolná vůči napadení helmintosporiózou v tobolkách, méně až středně odolná proti plísním. Rostlina máku je středně vysoká, méně odolná proti polehání i vyzimování. Výskyt hled'áků je nízký až středně vysoký. Tato odrůda se také využívá v potravinářství, vynos semen je středně vysoký až vysoký. Obsah oleje v semenech je vysoký, morfinu nízký (UKZÚZ, 2011).

Pěstební podmínky na poli v období od 1. 9. 2019 do 30. 6. 2020:

- Průměrná teplota: 9,46 °C
- Průměrná vlhkost: 77,1 %
- Průměrné měsíční srážky: 43,11 mm

#### **4.1.2 Odrůdy a genotypy pěstované ve skleníku**

Patnáct odrůd a hybridů máku setého byly pěstovány ve skleníku PřF UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, budova 51, výsev semen 6. 10. 2020.

- 20/3 = Titan x Zeno Plus
- 20/20 = Azurit x Oz
- 20/24 = Harlekýn x Zeno Plus
- 20/30 = Harlekýn x Oz
- 20/36 = Zeno Plus x Maraton
- 20/39 = Zeno Plus x Maraton
- 20/40 = Zeno Plus x Maraton
- 20/42 = Zeno Plus x Maraton
- 20/47 = Aplaus
- 20/48 = Oz
- 20/49 = Zeno Plus
- 20/50 = Titan
- 20/52 = Opex
- 20/53 = Bez názvu – ozimý (z genofondu)

- 20/54 = Orbis

Pěstební podmínky ve skleníku:

- Teplota: den 22 °C, noc 18 °C
- Světelné podmínky: přisvětlování 6:00–8:00, 17:00–12:00
- Intenzita osvětlení: 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
- Mák byl ošetřen TS Trisolem.

## 4.2 Přístrojové vybavení

V rámci bakalářské práce byly použity tyto přístroje:

- Předvážky Boeco Germany
- Analytické váhy BEL Engineering® s.r.l
- Míchačka magnetická vícemístná bez topení POLY 15 VARIOMAG®, 130–990 ot./min
- pH metr inoLab® pH 7110 SET 4
- Vodní lázeň Grant SUB
- Parní sterilizátor BMT VIPO
- Stolní lupa PZO WARSZAWA Nr. 7079
- Laboratorní inkubátor INCUCCELL 55 – ECO line
- Laboratorní inkubátor Biological Therm – BT 120
- Růstová skříňka Conviron Adaptis CMP 6010
- Průtokový cytometr Sysmex CyFlow Space

Práce ve sterilních podmínkách byla prováděna v laminárních boxech:

- Thermo Scientific CLEAN BENCH HERAGUARD HPH 50–60 Hz, 1300 W
- Gelaire Laminar Air Flow 220 V, 50 Hz

## 4.3 Použité chemikálie

### 4.3.1 Příprava médií

Pro přípravu médií byly použity tyto chemikálie

- Phyto Agar, Duchefa Biochemie B. V., Cat. No. 1003.1000
- Sacharóza, Lach-Ner, Cat. No. 40135-APO-G-0500-1
- Murashige a Skoog medium including vitamins, Duchefa Biochemie B. V., Cat. No. M0222.0050
- Casein Hydrolysate, Sigma-Aldrich, Cat. No. 22090-100G
- Růstové regulátory:
  - 2,4-D, Duchefa, Prod. No. D0911.0100
  - BAP, B3408
  - IAA, Sigma, Cat. No. 1-9837
  - IBA, Cat. No. 1-5386
  - KI, Sigma, K-3378
  - NAA, Sigma, N-0640
  - Zeatin riboside, Z-0879
  - PEO-IAA, poskytnuto Astou Žukauskaite, Dr.,Ph.D.
  - Auxinole, poskytnuto Astou Žukauskaite, Dr.,Ph.D.

## 4.4 Metody

Pro produkci homozygotních rostlin máku získaných kultivací prašníků v *in vitro* podmínkách byla použita metodika, která byla vypracována v rámci výzkumného projektu TAČR TA01010375 řešeného VÚRV, v. v. i.: Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití (Klíma a kol., 2014a). V rámci bakalářské práce byly některé kroky metodiky modifikovány. Bylo testováno předpůsobení (24 hodin v 35 °C) rostlinného materiálu a různé složení kultivačních médií.

#### **4.4.1 Odběr máku**

##### 4.4.1.1 Mák pěstovaný v polních podmínkách

Uzavřená poupata máku byla odebrána i s částí stonku. Odštížení stonku bylo provedeno pod prvním listem. Stonek s poupaty byl umístěn do kádinky se studenou vodou a do laboratoře byly vzorky přeneseny v polystyrenové krabici v co nejkratší době. Z poupat byly izolovány prašníky a kultivovány v den odběru.

##### 4.4.1.2 Mák pěstovaný ve skleníku

Z rostlin máku byla odebrána uzavřená poupata různých genotypů. Odběr byl proveden stejným způsobem jako u vzorků z pole, v co nejkratším čase. Z poupat byly izolovány prašníky a kultivovány v den odběru.

#### **4.4.2 Povrchová sterilizace poupat a izolace prašníků**

Poupata byla oddělena od stonku a sterilizována pomocí rozprašovače 70% ethanolem (v/v). Po 10 minutách, po oschnutí 70% ethanolu byla poupata přenesena na Petriho misku (Ø 90 mm). Izolace prašníků byla provedena pinzetou a skalpelem pod stolní binokulární lupou s osvětlením. Nejdříve byly odstraněny kališní a okvětní plátky, poté byla oddělena báze semeníku, ze které byly odděleny nitky s prašníky. Skalpelem pak byly nitky z prašníků odstraněny.

#### **4.4.3 Mikroskopické stanovení vývojové fáze mikrospor**

Pro zjištění vývojové fáze mikrospor byla vybrána poupata různých velikostí, z nich byly vypreparovány prašníky. Z prašníků byly připraveny roztlačové preparáty obarvené acetokarmínem. Připravený preparát byl pozorován pod mikroskopem při zvětšení (400x). Pro androgenezi máku je doporučováno středně jednojaderné vývojové stádium mikrospory, vyznačující se velkou vakuolou, jejíž objem zajímá více než polovinu mikrospory.

#### **4.4.4 Příprava kultivačních médií**

Ve skleněné láhvi s GL uzávěrem byla smíchána polovina objemu deionizované vody s Phyto-agarem. Roztok byl vložen do autoklávu a sterilizován (100 kPa, 121 °C).



Do druhé poloviny objemu vody bylo za stálého míchání na magnetické míchačce přidáno MS médium (Cat. No. M0222.0050, 4,4 g/l), kasein hydrolyzát, sacharóza a růstové regulátory. Po doplnění deionizovanou vodou na stanovený objem bylo změřeno pH. V případě, že bylo příliš nízké, bylo pH upraveno roztokem 1M KOH. Připravené médium bylo sterilizováno filtrací, za použití plastového filtru (Thermo Scientific NALGENE, 0,2  $\mu\text{m}$  a PES 75 nm). Obě láhve se sterilními roztoky byly vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 60 °C a smíchány v laminárním boxu. Připravené indukční médium bylo rozlito do Petriho misky  $\varnothing$  60 mm po 10 ml nebo do  $\varnothing$  90 mm po 25 ml. Regenerační médium bylo nalito po 25 ml do 100ml Erlenmeyerových baněk.

#### 4.4.4.1 Příprava rostlinných hormonů

Byly připraveny zásobní roztoky u všech růstových regulátorů, které byly přidávány do médií, v koncentraci 1mg = 1 ml.

#### 4.4.4.2 Příprava média pro indukci kalusů

V rámci bakalářské práce bylo celkem připravena a testována tři kultivační indukční média.

#### 1) Médium A.I podle Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 2)

Tabulka 2: Složení indukčního média A.I (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	30 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
2,4-D	2 mg/l
IAA	0,5 mg/l
BAP	0,5 mg/l
KI	1 mg/l

2) Médium A.II, mnou navržená modifikace média Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 3)

Tabulka 3: Složení indukčního média A.II, modifikace A.I (Dieu a Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	30 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
2,4-D	2 mg/l
BAP	1 mg/l
IAA	0,5 mg

3) Médium CHU (N6) (Ohnoutková a kol., 2019)

Toto médium se používá na indukci androgeneze u ječmene bylo však testováno i u androgeneze máku.

#### 4.4.4.3 Příprava média pro regeneraci rostlin

Pro regeneraci rostlin bylo celkem připraveno 8 regeneračních médií. Základem všech kultivačních médií bylo 4,4 g/l MS média včetně vitamínů a do všech médií bylo přidáno 20 g/l sacharózy a 1000 mg/l kasein hydrolyzátu. Jednotlivá média se od sebe lišila obsahem a koncentracemi růstových regulátorů.

1) Médium B.I podle Dieuho a Dunwella (1988) (Tab. 4)

Tabulka 4: Složení kultivačního média B.I pro regeneraci rostlin (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
BAP	0,1 mg/l
KI	0,5 mg/l

2) MS médium bez hormonů (Dieu, Dunwell, 1988) (Tab. 5)

Tabulka 5: Složení kultivačního média pro regeneraci rostlin – bez hormonů

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l

3) Médium MS-J – původně pro regeneraci ječmene (Tab. 6)

Tabulka 6: Složení kultivačního média pro regeneraci rostlin – původně pro regeneraci ječmene

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
NAA	0,5 mg/l
KI	0,5 mg/l

Média pro regeneraci prýtlů se Zeatin ribosidem: ZR1, ZR2.

4) Médium ZR1 (Tab. 7)

Tabulka 7: Složení kultivačního média pro regeneraci rostlin se Zeatin ribosidem (ZR1)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
Zeatin riboside	0,5 mg/l

5) Médium ZR2 (Tab. 8)

Tabulka 8: Složení kultivačního média pro regeneraci rostlin se Zeatin ribosidem (ZR2)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
Zeatin riboside	1 mg/l

Média B.II, B.III a B.IV obsahují inhibitory auxinů PEO-IAA a Auxinole:

6) Médium B.II, modifikace Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 9)

Tabulka 9: Složení regeneračního média B.II (2021), modifikace B.I (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
BAP	0,1 mg/l
KI	0,5 mg/l
PEO-IAA	1 mg/l

7) Médium B.III, modifikace Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 10)

Tabulka 10: Složení regeneračního média B.III (2021), modifikace B.I (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
BAP	0,1 mg/l
KI	0,5 mg/l
PEO-IAA	2 mg/l

8) Médium B.IV, modifikace Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 11)

Tabulka 11: Složení média B.IV (2021), modifikace B.I (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	4,4 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
BAP	0,1 mg/l
KI	0,5 mg/l
Auxinole	1 mg/l

#### 4.4.4.4 Příprava média pro tvorbu kořenového systému

Pro indukci růstu kořenů bylo připraveno pouze jedno médium.

1) Médium C<sub>x</sub>, modifikace Dieu a Dunwella (1988) (Tab. 12)

Tabulka 12: Složení kultivačního média C<sub>x</sub> (2021), modifikace C (Dieu, Dunwell, 1988)

Organické komponenty	Množství
MS	2,2 g/l
Kasein hydrolyzát	1000 mg/l
Sacharóza	20 g/l
Phyto agar Duchefa	6 g/l
Růstové regulátory	Množství
IBA	2 mg/l

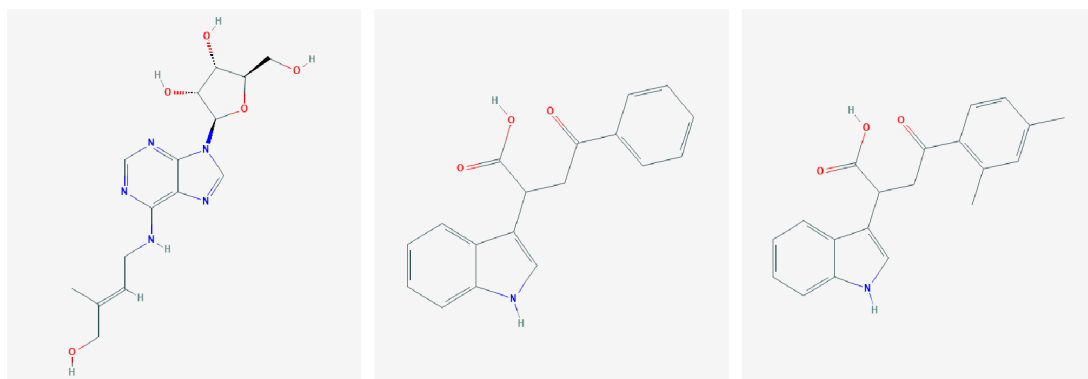
Všechna uvedená média byla připravená s hodnotou pH 5,8–6,0.

Poznámka:

Zeatin riboside – N6-(trans-4-hydroxy-3-metyl-2-buten-1-yl)adenosin, v přírodě se vyskytující cytokinin, indukuje dělení buněk a stimuluje proliferaci výhonků, aktivuje genovou expresi a metabolickou aktivitu.

PEO-IAA – (kyselina 2-(1H-indol-3-yl)-4-oxo-4-fenyl-máselná), inhibitor auxinů.

Auxinole – (kyselina 4-(2,4-dimethylfenyl)-2-(1H-indol-3-yl)-4-oxobutanová) inhibitor auxinů, váže se na TIR1/AFB receptory, přímo na TIR1, tím je blokován vznik komplexu TIR1-IAA-Aux/IAA a genová exprese auxinů.



Obrázek 2: Strukturální vzorce, zleva: *trans*-Zeatin riboside, PEO-IAA, Auxinole; Převzato: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### **4.4.5 Kultivace prašníků**

Na médium v Petriho miskách Ø 60 mm byl pomocí vysterilizované pinzety a skalpelu přenesen prašník tak, aby se jizva po nitce nedotýkala média. Jednotlivé prašníky byly pokládány na povrch média tak, aby se mezi sebou vzájemně nedotýkaly. Petriho miska byla uzavřena parafilmem a kultivována v inkubátoru ve tmě při teplotě 24 °C. Přibližně po šesti týdnech byly kalusy pasážovány na regenerační médium a kultivovány v růstové komoře Adaptis (23 °C, 16 hodin světlo a 8 hodin tma).

#### **4.4.6 Pasážování**

Kalusy na regeneračním médiu byly každé tři až čtyři týdny pasážovány na nové médium.

#### **4.4.7 Stanovení ploidie regenerovaných rostlin**

Ploidie regenerovaných rostlin byla stanovena průtokovým cytometrem, podle obsahu jaderné DNA. Stanovení bylo provedeno pod vedením Mgr. Petra Cápala, Ph.D. na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

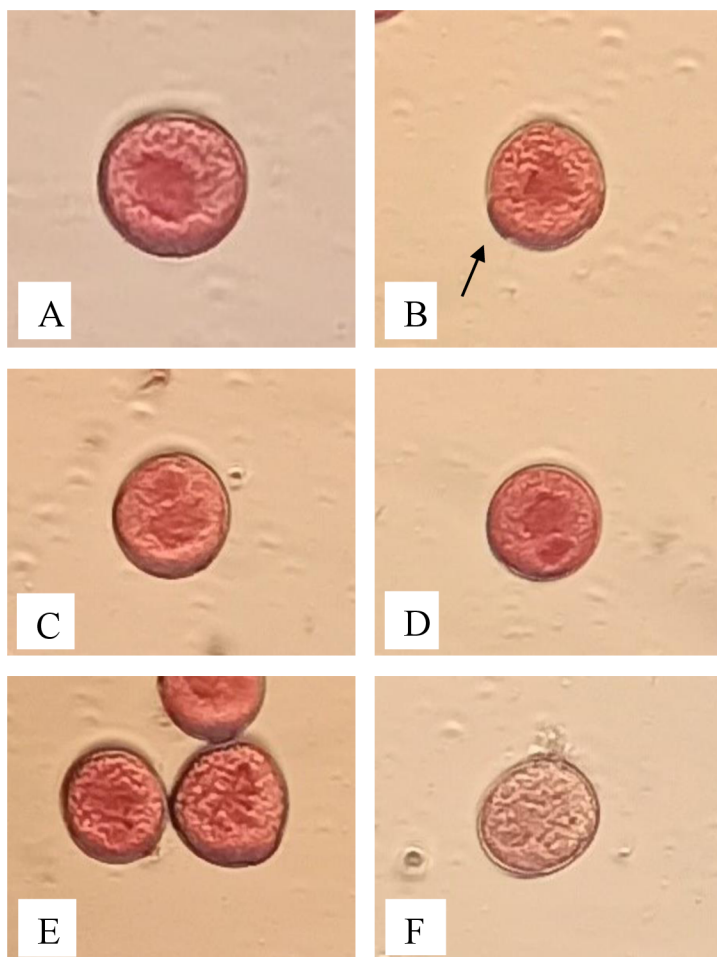
Vzorky byly připraveny podle protokolu Doležel a Göhde (1995). Mladé listy o velikosti 1 cm byly odebrány z regenerovaných rostlin v baňkách. List byl na Petriho misce rozsekán v 0,5 ml roztoku Otto I, přefiltrován přes nylonovou membránu do nové zkumavky a přidán byl 1 ml roztoku Otto II. Ke vzorku bylo přidáno 2 µl proteázy a 5 µl propidium iodidu. Ploidie připravených vzorků byla zjištěna průtokovým cytometrem Sysmex CyFlow Space. Analyzované vzorky byly srovnávány s diploidní kontrolní rostlinou.

## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení vývojové fáze mikrospory v závislosti na velikosti poupat

#### 5.1.1 Stanovení vývojové fáze mikrospory

Vývojové stádium mikrospory bylo stanoveno světelným mikroskopem Olympus BX 50 (zvětšení 400x). Byl připraven roztlakový preparát prašníků poupat různých velikostí. Jako ideální vývojové stádium mikrospor pro získání haploidních/dihaploidních rostlin máku setého je uváděno středně jednojaderné (Dieu a Dunwell, 1988; Klíma a kol., 2014a).



Obrázek 3: Vývojová stádia mikrospor, barveno acetokarminem (zvětšení 400x). A, B – středně jednojaderné stádium (K-OZ, O-OZ); B – klíčící otvor (šipka); C, D – dvojjaderné stádium (H-ZE); E – pylová mitóza; F – neživá mikrospora. Foto autor.



Pod mikroskopem byly pozorovány mikrospory se stádiem středně jednojaderným, dvojjaderným, dokonce i mikrospory s probíhající pylovou mitózou (Obr. 3).

### 5.1.2 Optimální velikost poupat pro izolaci mikrospor

- a) **Poupata z pole:** Z pole, ze tří odrůd byla odebrána poupata různé velikosti a délky stonku mikrospor (Obr. 4 A). U vypreparovaných prašníků byla stanovena vývojová stádia mikrospor. U odrůdy Oz, poupěte značeného K-OZ bylo zjištěno optimální středně jednojaderné stádium mikrospory, poupě mělo délku 23 mm, stonk byl dlouhý 20 mm a prašík 3 mm. U druhého poupěte stejné odrůdy značeného O-OZ, které mělo délku 26 mm, stonk 19 mm a prašík 3,5 mm, bylo taktéž zjištěno optimální, středně jednojaderné stádium mikrospor. Dvojjaderné stádium bylo pozorováno u poupěte H-ZE odrůdy Zeno Plus o délce 40 mm, jehož stonk měřil 41 mm a prašík 4 mm.

U některých poupat větších délek přesto v některých případech byly prašíky menší velikosti (G-ZE) i naopak u malých poupat byly přítomny prašíky dlouhé (P-OZ). Proto nelze jednoznačně prokázat spojitost mezi délkou poupěte, délkou jejich prašníků a vývojovým stádiem mikrospory.



Obrázek 4: Stanovení vývojové fáze mikrospory v závislosti na velikosti poupat  
A – Vývojová stádia poupat s ohledem na velikost stopky; B – poupě O-OZ; C – poupě K-OZ.  
Foto autor.

- b) **Poupata ze skleníku:** Jelikož se u předchozího experimentu neprokázalo, že by délka poupěte určovala i vývojové stádium mikrospory, byla ze skleníku odebírána poupata různých velikostí (od 18 do 30 mm). Také bylo u vzorků z pole zjištěno, že nejvíce kalusů roste z prašníků o velikosti 4 mm (52 %) a 3 mm (33,9 %), proto z rostlin pěstovaných ve skleníku byla pro kultivaci vybrána poupata s prašníky o podobné délce.

## 5.2 Sterilizace poupěte

Bylo zjištěno, že dostačujícím sterilizačním prostředkem poupat před preparací prašníků byl 70% ethanol. Z celkových 96 Petriho misek bylo kontaminováno pouze šest. Všechny tyto kultivované prašníky byly izolovány z poupat rostlin pěstovaných v polních podmínkách.

## 5.3 Androgeneze máku z rostlinného materiálu pěstovaného v polních podmínkách

### 5.3.1 Indukce kalusů

Z rostlin pěstovaných v polních podmínkách bylo v období od 25. května do 1. července 2020 odebráno 29 poupat ze tří různých odrůd (OZ, Titan, Zeno Plus). Průměrná délka poupat činila 28 mm. Z poupat byly vypreparovány prašníky o průměrné délce 3,5 mm. Na dvou indukčních médiích (A.I a MN6) bylo celkem kultivováno 2271 prašníků, které byly v průměru po 41 prašnicích kultivované v 56 Petriho miskách Ø 90 mm (Obr. 3 A). Na indukčním médiu A.I bylo kultivováno 1513 prašníků a na médiu MN6 bylo kultivováno 758 prašníků.

Po 6 týdnech kultivace v termostatu, ve tmě, při 24 °C byla hodnocena indukce kalusů.

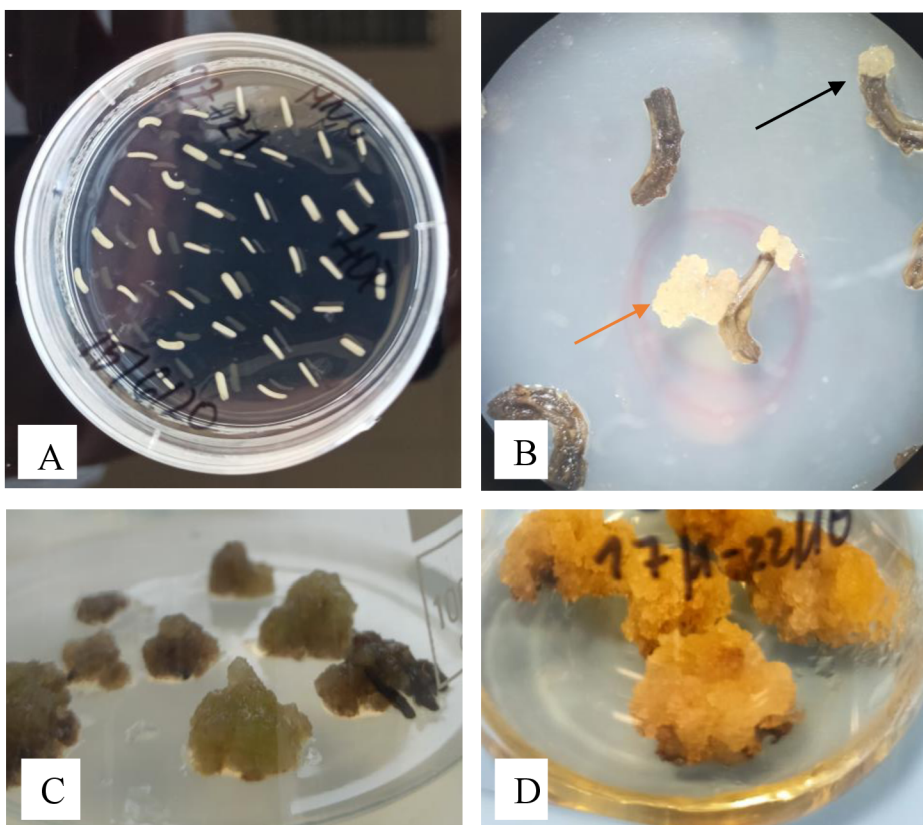
Na médiu A.I byl pozorován rozdíl v indukci kalusů u jednotlivých odrůd. Největší procento reagujících prašníků bylo pozorováno u odrůdy Oz (10,2 %, 107 kalusů), ze 135 kultivovaných prašníků odrůdy Titan 5,9 % tvořilo kalus (8 kalusů). U odrůdy Zeno Plus bylo kultivováno 333 prašníků, u žádného z nich nebyl kalus indukován. Na médiu MN6 nedošlo k žádné tvorbě kalusů (Tab. 13).

Tabulka 13: Indukce kalusů

Odrůda	Indukční médium					
	A.I			MN6		
	Počet kultivovaných prašníků	Počet reagujících prašníků	%	Počet kultivovaných prašníků	Počet reagujících prašníků	%
Oz	1045	107	10,2	564	0	0
Titan	135	8	5,9	67	0	0
Zeno +	333	0	0	127	0	0
Celkem	1513	115	7,6	758	0	0

Dobře rostoucí kalusy byly pasážovány na regenerační médium B.I a kultivovány na světle v růstové komoře. Po dvou měsících, kdy nedocházelo k regeneraci, byly kalusy pasážovány na médium bez hormonů nebo médium pro regeneraci ječmene. Po měsíci bylo vyzkoušeno další regenerační médium s přidavkem Zeatin ribosidu (ZR1), kdy došlo k růstu kalusů. Kultivace na médii ZR1 trvala 5 měsíců, médium bylo obměňováno každý měsíc. Po celou dobu kultivace nedocházelo na žádném z médií k regeneraci, kalusy byly světle hnědé a vodnaté (Obr. 5 C, D).

Celkové výsledky indukce kalusů, donorových rostlin pěstovaných na poli v Příloze I (Tab. 17).



Obrázek 5: Průběh kultivace prašníku máku setého z rostlin pěstovaných v polních podmínkách. A – Kultivace prašníků máku v *in vitro* podmínkách, médium MN6; B – Indukce kalusu máku setého na médiu A.I, 6 týdnů kultivace, vznik kalusu z nitky (černá šipka), vznik kalusu z prašníku (oranžová šipka); C – Kalusy na médiu bez hormonů, po druhé pasáži na regeneračním médiu; D – Kalusy po přidání Zeatin ribosidu (médium ZR2) po dvou měsících kultivace. Foto autor.

## 5.4 Androgenese máku z rostlinného materiálu pěstovaného ve skleníku

### 5.4.1 Kultivace prašníků

V období od 13. ledna do 3. února 2021 bylo odebráno dohromady 40 pupat 15 genotypů, které byly pěstovány ve skleníku. Průměrná délka pupat byla 24 mm, průměrná délka prašníků byla 3,5 mm. Na dvou indukčních médiích (A.I a A.II) bylo celkem založeno 41 Petriho misek (Ø 60 mm) s 2069 prašníky. Na médiu A.I bylo kultivováno 1250 prašníků a na A.II 819 prašníků. Petriho misky byly rozděleny na polovinu a na každé polovině byl kultivován jiný genotyp. Kultivovány byly ve tmě, při teplotě 24 °C.

U některých prašníků genotypů 20/30, 20/48 20/49, 20/36, 20/03, 20/20, 20/24, 20/42, 20/52, 20/53 a 20/54 byla na začátku kultivace nastavena po dobu 24 hodin teplota 35 °C. U prašníků, kde bylo aplikován stres ve formě tepelného předpůsobení nebyl sledován vliv na indukci nebo kvalitu kalusů.

Po 8 týdnech kultivace byla hodnocena indukce kalusů. Nejvíce kalusů na médiu A.I bylo indukováno u genotypu 20/53 (25 %, 7 kalusů), avšak bylo kultivováno pouze 28 prašníků. Nejvyšší počet reagujících prašníků, které vytvářejí kalus bylo získáno u genotypu 20/30, celkem 27 z 218 prašníků (12,4 %). Dále byl vznik kalusů pozorován u genotypu 20/20 (7 %, 6 kalusů), 20/42 (4,5 %, 7 kalusů), 20/50 (17,8 %, 7 kalusů). Na médiu A.II došlo k indukci kalusů pouze u genotypu 20/30 (9 %, 19 kalusů) (Tab 14).

Tabulka 14: Indukce kalusů

Genotyp	Indukční médium					
	A.I			A.II		
	Počet kultivovaných prašníků	Počet reagujících prašníků	%	Počet kultivovaných prašníků	Počet reagujících prašníků	%
20/03	37	0	0	0	0	0
20/20	86	6	7	0	0	0
20/24	55	0	0	0	0	0
20/30	218	27	12,4	212	19	9
20/36	120	0	0	79	0	0
20/39	69	0	0	68	0	0
20/40	67	0	0	67	0	0
20/42	157	7	4,5	118	0	0
20/47	76	0	0	79	0	0
20/48	46	0	0	40	0	0
20/49	49	0	0	47	0	0
20/50	45	8	17,8	37	0	0
20/52	74	0	0	40	0	0
20/53	28	7	25,0	32	0	0
20/54	123	0	0	0	0	0
Celkem	1250	55	4,4	819	19	2,3

Celkové výsledky indukce kalusů, donorových rostlin pěstovaných ve skleníku v Příloze II (Tab. 18).

Dobře rostoucí kalusy byly pasážovány na regenerační médium ZR1 nebo na regenerační médium B.I. (Klíma a kol.,2014a). Kultivovány byly v růstové komoře při teplotě 16 °C, fotoperiodě 16/8 hodin.

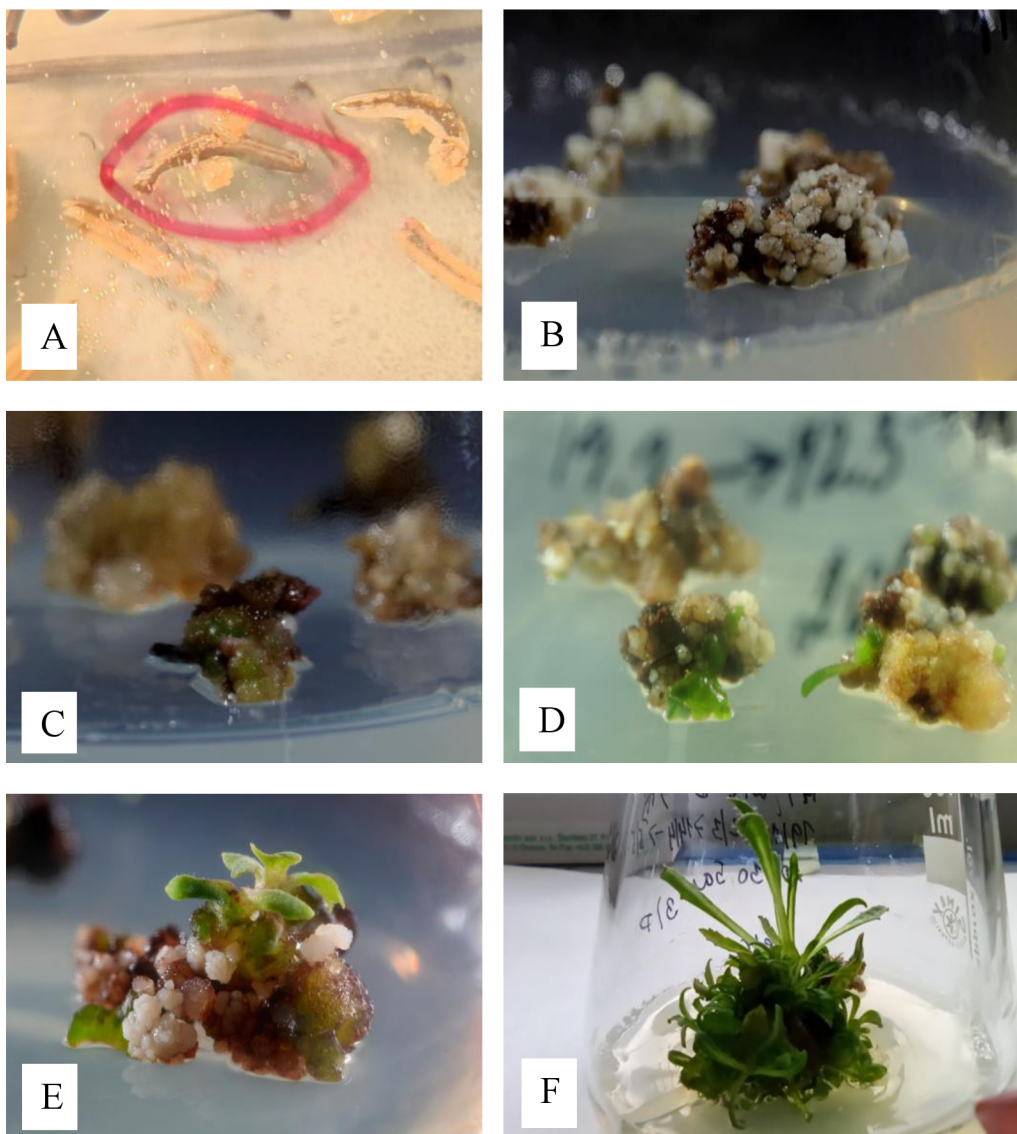
#### 5.4.2 Regenerace rostlin

Po čtyřech týdnech a opakovaných pasážích, vždy po dvou týdnech, nedocházelo k regeneraci rostlin na médiu B.I (Klíma a kol.,2014a), ani na médiích, do kterých byl přidán Zeatin riboside (ZR1, ZR2). Kalusy na médi B.I byly světle hnědé a vodnaté, kdežto na médiu ZR1 byly tmavé a suché. Po konzultaci s doc. Karlem Doležalem bylo doporučeno pro regeneraci použít inhibitory auxinů PEO-IAA v médiu B. II. Po přidání PEO-IAA docházelo po týdnu ke vzniku embryonálních struktur na povrchu kalusů (Obr. 6 B) a po dalším týdnu ke vzniku zelených center u kalusů, které byly původně na médiu ZR1 (Obr. 6 C). Po dalších třech týdnech se objevily první listy (Obr. 6 D). Kalusy se zelenými listy byly přeneseny na médium B.III, na kterém po čtyřech týdnech listy dorostly délky 3–5 cm (Obr. 6 F). Takto vzrostlé rostliny byly pasážovány na zakořeňovací médium C<sub>x</sub> a byla u nich zjišťována ploidie pomocí průtokové cytometrie.

K úplné regeneraci došlo pouze u genotypu 20/30. Všechny regenerované rostliny pocházely z prašníků jednoho poupěte. Celkem z 23 kalusů regenerovalo 6 rostlin (23,1 %) (Tab. 15).

Tabulka 15: Regenerace rostlin, kombinace médií ZR1, B.II, B.III

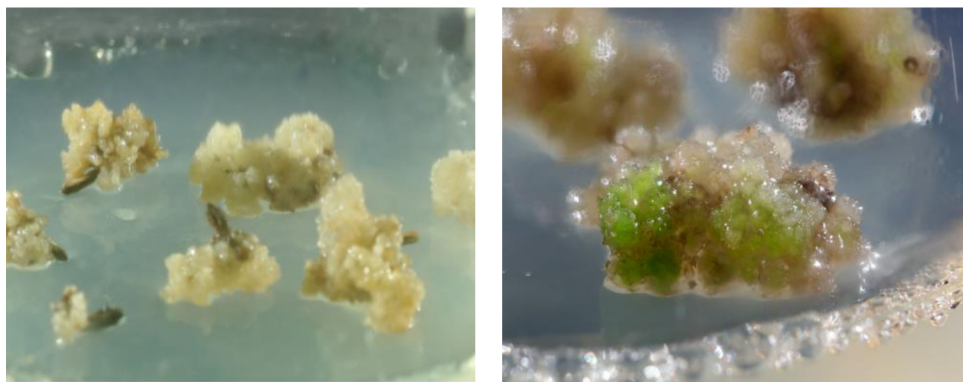
Genotyp	Regenerační médium		
	ZR1 → B.II → B.III		
	Počet kultivovaných kalusů	Počet regenerovaných rostlin	%
20/20	10	0	0
20/30	26	6	23,1
20/42	1	0	0
20/50	2	0	0
20/53	8	0	0
Celkem	47	6	12,8



Obrázek 6: Vývoj kalusů máku setého z prašníků donorových rostlin genotypu 20/30 pěstovaných ve skleníku A – Indukce kalusů na médiu A.I. po 7 týdnech kultivace; B – Tvorba embryonálních struktur na kalusu po týdnu kultivace na médiu B.II; C – Tvorba zelených center uvnitř kalusu po dvou týdnech kultivace na médiu B.II; D – Vznik prvních listů na médiu B.II po pěti týdnech kultivace a dvou pasážích; E – Růst listové růžice po týdnu kultivace na médiu B.III; F – Rostlina máku setého ve fázi několika pravých listů po 4 týdnech kultivace na médiu B.III. A,F foto autor. B–E foto Blahoušek.

Kalusy, u kterých nedocházelo k regeneraci byly po dohodě s doc. Karlem Doležalem přeneseny na médium B.IV, které obsahuje inhibitor auxinů Auxinole. Auxinole má silnější účinek jak PEO-IAA i v nižších koncentracích. Po přidání 1mg/l

Auxinole docházelo po třech týdnech kultivace ke vzniku zelených center u kalusů z poupat 20/30.1a, 20/30.5a, 20/30.5b, 20/30.8b (Obr. 7).

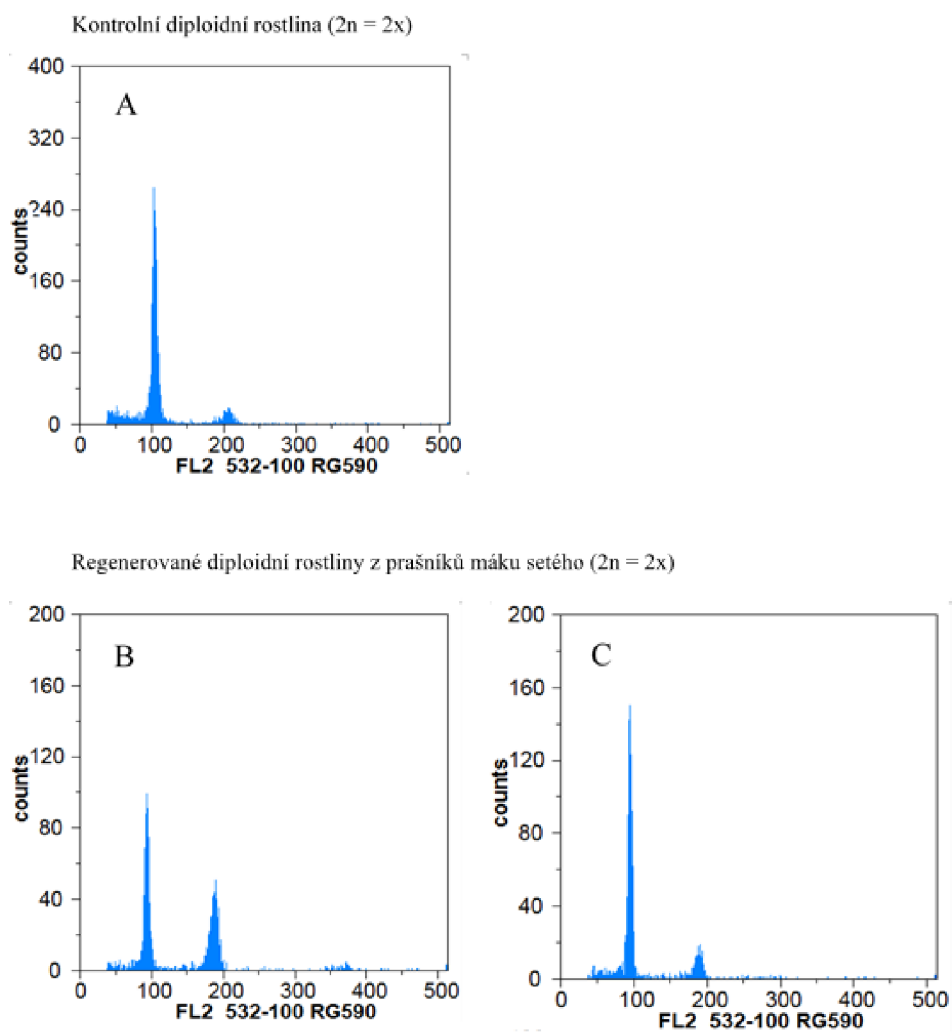


Obrázek 7: Tvorba zelených center při použití inhibitoru auxinů Auxinolu (20/30.1a), kultivace na médiu B.IV po dobu tří týdnů. Foto Blahoušek.

#### 5.4.1 Stanovení ploidie regenerovaných rostlin

U 6 regenerovaných rostlin, jejichž listy dosahovaly délky 3–5 cm byla zjištěna ploidie pomocí průtokové cytometrie. S diploidní kontrolní rostlinou ( $2n$ ) byly srovnávány výsledky analýzy všech zkoumaných regenerovaných rostlin. Všechny analyzované rostliny pocházely z genotypu 20/30.5a. Je zajímavé, že všechny regenerované rostliny pochází z různých prašníků jednoho poupěte. U všech těchto rostlin byl zjištěn diploidní počet chromozomových sad ( $2n = 2x = 22$ ) (Obr. 8). Nelze s určitostí říci, zda tyto diploidní rostliny vznikly regenerací z diploidního pletiva prašníků, nebo vznikly spontánní dihaploidizací.





Obrázek 8: Stanovení ploidy průtokovým cytometrem. A – Kontrolní diploidní rostlina máku; B – Regenerovaná diploidní rostlina genotypu 20/30.5a-1; C – Regenerovaná diploidní rostlina genotypu 20/30.5a-2b.

## 6 Diskuze

Tématika androgeneze máku setého byla doposud publikována pouze v jedné zahraniční vědecké práci (Dieu a Dunwell, 1988). Dalším dostupným zdrojem je „Metodika *in vitro* kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití“ vypracována Výzkumným ústavem rostlinné výroby, v. v. i. (Klíma a kol., 2014a). Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu TAČR TA01010375 „Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého“. Kalusy z prašníků máku setého, získané z předchozích experimentů, včetně metodiky, byly použity k testování regenerační schopnosti a tvorby kořenů (Klíma a kol., 2014b). Byly testovány tři různé varianty agarem solidifikovaných médiích s různými růstovými regulátory. Obě práce (Klíma a kol., 2014a; Klíma a kol., 2014b) vychází z publikace Dieu a Dunwell (1988).

Z obou publikovaných zdrojů vyplývá, že je velmi důležitý způsob pěstování donorových rostlin. Dieu a Dunwell (1988) pěstovali donorové rostliny v řízených podmínkách růstové komory (pěstební podmínky: 35 dní 15 °C, fotoperioda 12 hodin, intenzita osvětlení 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  nebo 240  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Po měsíci byla polovina donorových rostlin přenesena na pole, druhá polovina rostlin byla kultivována v růstové komoře (teplota 25 °C, fotoperioda 16 hodin, intenzita osvětlení 240  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Klíma a kol. (2014a) pěstovali donorové rostliny čtyřmi způsoby, ve skleníku nebo v poli, v závislosti na období odběru explantátů. Důraz byl přikládán na přihnojování a přesazování rostlin.

Z našich experimentů vyplývá, že v procesu androgeneze je velký rozdíl v indukci kalusů a regeneraci rostlin mezi donorovými rostlinami, které jsou pěstovány v polních podmínkách a v řízených podmínkách, ve skleníku. U prašníků, které byly odebrány z rostlin pěstovaných na poli došlo sice k indukci kalusů, ale nikoli k regeneraci. U prašníků z rostlin pěstovaných ve skleníku byla pozorována indukce kalusů i regenerace rostliny. Asif (2013) ve své práci uvedl, že donorové rostliny u většiny druhů, které jsou pěstované v řízených podmínkách skleníku poskytují lepší embryogenní odpověď než rostliny pěstované na poli.

V bakalářské práci, stejně jako v publikaci Klíma a kol. (2014a), byl pro sterilizaci poupat použit 70% ethanol. Ukázalo se, že tato použitá sterilizace je dostačující, výskyt kontaminace v našich experimentech byl minimální (6/96). Dieu a Dunwell (1988)

použili 95% alkohol, který je zbytečně příliš koncentrovaný a mohl by mít negativní vliv na vitalitu prašníků.

U některých druhů rostlin předpůsobení, ať již chladové nebo tepelným šokem, vyvolává zvýšení androgenní schopnosti. Dieu a Dunwell (1988) ve svých experimentech aplikovali chladové předpůsobení 0, 2 a 7 dní při 7 °C. Zjistili, že chladové předpůsobení u některých odrůd zvyšuje po sedmi dnech tvorbu kalusů. Bez chladového předpůsobení se vytvářelo 2,4 kalusů/100 prašníků, po sedmi dnech chladového předpůsobení bylo indukováno 6,0 kalusů/ 100 prašníků.

V bakalářské práci bylo testováno předpůsobení tepelným šokem při 35 °C po dobu 24 hodin. U analyzovaných prašníků nebyl zaznamenán žádný vliv na indukci androgenese.

Důležité je před kultivací určit vývojové stádium mikrospory. Dieu a Dunwell (1988) určovali vývojové stádium mikroskopicky a stanovili jako optimální jednojaderné stádium. Sledovali i vývoj mikrospor v dalších stádiích vývoje po dobu 21 dní. Klíma a kol. (2014a) stanovovali vývojové stádium mikrospory také mikroskopicky, podle velikosti vakuoly, ale i nepřímo, podle délky okvětních plátků a semeníku. Jako optimální stádium určili středně jednojaderné až časně dvojjaderné.

V našem experimentu odrůdy vykazovaly rozdíly mezi velikostí poupěte a velikostí prašníků. Jako limitující faktor u indukce androgenese máku se prokázala velikost prašníků, ne velikost poupěte. Podle velikosti poupěte a stopky se nedala předem určit velikost prašníků. Velikost poupat, ve kterých byly prašníky v jednojaderném stádiu se lišila u rostlin, které byly pěstovány na poli a těch, které byly pěstovány ve skleníku.

Z většiny prací vyplývá, že jedním z nejdůležitějších faktorů v procesu androgenese, indukci kalusů a regeneraci rostlin je vliv genotypu. Kahrizi a kol. (2011) zkoumali vliv 12 genotypů na androgenezi ječmene a zjistili, že u dvou genotypů je mnohem vyšší indukce kalusů než u ostatních genotypů (No. 9 74,792 % a No.7 62,915 %). Nejvyšší regenerace byla pozorována u genotypu, který tvořil největší procento kalusů (No. 9 7,293 %). Klíma a kol. (2014b) pozorovali nejvyšší regeneraci prýtlů z kalusů u ozimé odrůdy máku genotypu 24/6 (60 %). Naopak Dieu a Dunwell (1988), kteří se zabývali indukcí kalusů z prašníků u 43 genotypů, kdy 25 z nich reagovalo, zjistili, že genotyp není limitujícím faktorem androgenese.

U námi zkoumaných kalusů došlo k regeneraci rostlin pouze u kalusů genotypu 20/30 (23,1 %).

V neposlední řadě hraje významnou roli složení indukčního a regeneračního média. Dieu a Dunwell (1988) použili pro indukci kalusů z prašníků MS médium bez hormonů a médium A.19, které obsahovalo fytohormony (2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l IAA, 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l KI). Médium A.19 má stejné složení jako médium A.I, které bylo použito v této bakalářské práci i jako médium A (Klíma a kol., 2014a). Ze 158 pupat, které byly kultivovány na médiu A.19 byly indukovány kalusy u 75 pupat (47,5 %). Na MS médiu nedocházelo k žádné indukci.

V rámci bakalářské práce byla nejvyšší indukce kalusů pozorována na indukčním médiu A.I (6,2 %). Na médiu A.II byla indukce 2,3 %, na médiu MN6 se kalusy netvořily. Pro regeneraci rostlin použil Dieu a Dunwell (1988) médium R, které je shodné s médiem B (Klíma a kol. 2014a) a také s médiem B.I použitým v bakalářské práci. Dieu a Dunwell (1988) zjistili, že regenerace se urychlí přenesením rostlin z média R na MS médium bez hormonů. Z 367 získaných kalusů regenerovalo celkově 140 rostlin, některé z rostlin pocházely ze stejných kalusů. Ploidie byla stanovena u 63 rostlin, potvrzena byla 1 haploidní rostlina, 2 mixoploidní a 60 diploidních. Aneuploidní rostliny nebyly pozorovány.

V našich experimentech bylo použito osm regeneračních médií. Nejvyšší regenerace bylo dosaženo na kombinaci médií ZR1 (0,5 mg/l Zeatin riboside), B.II (0,1 mg/l BAP, 0,5 mg/l KI, 1 mg/l PEO-IAA) a B.III (0,1 mg/l BAP, 0,5 mg/l KI, 2 mg/l PEO-IAA). Ze 4340 prašníků regenerovalo pouze 6 rostlin, všechny byly z genotypu 20/30. Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno že všechny rostliny byly diploidní ( $2n = 2x = 22$ ). Donorové rostliny regenerovaných rostlin pocházely, které byly pěstovány ve skleníku.

## 7 Závěr

V rámci bakalářské práce byla zpracována literární rešerše, kde byly shrnuty dosavadní dostupné informace o pěstování máku setého a o androgenezi.

V praktické části byly kultivovány prašníky máku setého různých odrůd i genotypů, které byly pěstovány v různých podmínkách, na poli nebo ve skleníku s cílem získat haploidní případně dihaploidní rostliny.

Pro indukci kalusů byly použity tři indukční média. K nejvyšší indukci kalusů docházelo na indukčním médiu A.I (23,1 %). K regeneraci rostlin bylo testováno osm regeneračních médií. K regeneraci prýtlů a rostlin docházelo u kalusů, které byly kultivovány na kombinaci médií ZR1, B.II, a B.III. Ukázalo se, že regeneraci významně ovlivňuje růstový hormon Zeatin riboside a inhibitor auxinů PEO-IAA.

K regeneraci celistvých rostlin došlo pouze u genotypu 20/30, a to z prašníků, které pocházely z jednoho poupěte (20/30.5a) odebraného ze skleníku. U ostatních kalusů genotypu 20/30 docházelo pouze k regeneraci prýtlů. Potvrdilo se, že schopnost regenerace kalusů je významně ovlivněna genotypem.

Průtokovou cytometrií se potvrdilo, že všechny regenerované rostliny byly diploidní. Nelze však s jistotou určit, zda rostliny regenerovaly z diploidního pletiva, nebo vznikly spontánní dihaploidizací.

Androgeneze u máku setého není rutinní metoda a uplatnění v praxi vyžaduje optimalizaci postupu u jednotlivých odrůd.

## 8 Použitá literatura

1. Asif M. (2013). *Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production*, pp. 4, 10, Springer International Publishing, Switzerland. ISBN 978-3-319-00731-1.
2. Bechyně M., Kadlec T., Vašák J. (2001). *Mák*, pp. 13–18, Agrospoj, Praha, ČR. ISBN 80-239-4237-9.
3. Bernath J. (1999). *Poppy: The Genus Papaver*, pp. 114, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. ISBN 978-9-0570-2271-5.
4. Bhojwani S. S., Razdan M. K., (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, pp. 178, Elsevier, Netherlands. ISBN 978-0-0805-3909-6.
5. Bhojwani S. S., Dantu P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*, pp. 94–94, Springer, India. ISBN 978-81-322-1025-2.
6. Bohanec B., In Touraev A., Forster B. P., Mohan Jain S. (2008). Doubled Haploids via Gynogenesis, *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, pp. 35, Springer, Dordrecht. ISBN 978-1-4020-8853-7.
7. ČSU [Český statistický úřad] *Odhad sklizně zemědělských plodin* [tabulka] (15.9.2018). In Český statistický úřad [online]. [cit. 2021-2-24]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/odhady-sklizne-operativni-zprava-k-15-9-2018>
8. ČSU [Český statistický úřad] *Odhad sklizně zemědělských plodin* [tabulka] (15.9.2019) In Český statistický úřad [online]. [cit. 2021-2-24]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/odhady-sklizne-operativni-zprava-k-15-9-2019>
9. ČSU [Český statistický úřad] *Odhad sklizně zemědělských plodin* [tabulka] (15.9.2020). In Český statistický úřad [online]. [cit. 2021-2-24]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/odhady-sklizne-operativni-zprava-k-15-9-2020>
10. Datta S. K. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement, *Current Science*, VOL. **89**, pp. 1870-1878.
11. Dhooghe E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*, *Plant Cell Tiss Organ Cult* **104**, pp. 359–360.
12. Dieu P., Dunwell J. M. (1988). Anther culture with different genotypes of opium poppy (*Papaver somniferum* L.): effect of cold treatment, *Plant Cell Tiss Organ Cult* **12**, pp. 263–271.

13. Doležel J., Gohde, W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19, 103-106.
14. Gabrovská D. (19. 12. 2019). *Český modrý mák* [online]. Praha: [cit. 2021-3-1]. Dostupné z: <https://www.cechovninormy.cz/norma/cesky-modry-mak/>
15. Germanà M. A. (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid product, ion, *Plant Cell Tiss Organ Cult* **104**, pp. 283–300.
16. Germanà M. A. (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep* **30**, pp. 839–857.
17. Chu, C. C. (1981). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops, *Proceedings of symposium on plant tissue culture*, Pitman Press, Boston, pp 43–50.
18. Jahan-Tigh R. R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K. (2012). Flow cytometry, *Journal of Investigative Dermatology* **132**, pp. 1-6.
19. Kahrizi D, Mahmoodi S., Bakhshi Khaniki G., Mirzaei M. (2011). Effect of genotype on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Biharean Biologist* **5(2)**, pp.132-134.
20. Kapoor L. D. (1995). *Opium Poppy: Botany, Chemistry, and Pharmacology (1st Edition)*, pp. 22, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. ISBN 978-07-890-0202-0
21. Kiviharju E., Pehu E. (1998). The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **54**, pp. 97–104.
22. Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V. (2014a). *Metodika in vitro kultivace máku setého a produkce homozygotních materiálů pro šlechtitelské využití*, pp. 6–9, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha–Ruzyně, ČR. ISBN 978-80-7427-168-7
23. Klíma M., Hilgert A., Urban M. (2014b). Regenerace celistvých rostlin máku setého (*Papaver somniferum* L.) v *in vitro* kulturách, *Úroda* **12**, pp. 199.
24. Kuchtová P., Hájková M., Havel J., Kazda J., Plachá E., Dvořák P. (2013). *Pěstitelská technologie máku pro ekologické zemědělství*, pp. 6–7, Česká zemědělská univerzita v Praze Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra rostlinné výroby a OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Praha 6 – Suchdol, ČR, ISBN: 978-80-213-2429-9

25. Kumar S., Mishra S., Mishra A. P. (2016). *Plant Tissue Culture: Theory and Techniques*, pp. 38–51, Scientific Publishers, Jodhpur, India. ISBN 978-81-7233-602-8
26. Labanca F., Ovesnà J., Milella L. (2018). *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways, *Phytochem Rev* **17**, pp. 856.
27. Lima G. P. P., da Silva Campos R. A., Willadino L. G., Câmara, Vianello F. (17. 10. 2012). Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors, In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, Leva A., Rinaldi L. M. R., IntechOpen, Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/polyamines-gelling-agents-in-tissue-culture-micropropagation-of-medicinal-plants-and-bioreactors>
28. Makowska K., Oleszczuk S. (2014). Albinism in barely androgenesis, *Plant Cell Rep* **33**, pp. 385–392.
29. Mikšík V. (2019, 8). Cechovní norma ochrání mák vypěstovaný v ČR. *AGRObase*, 14.
30. Mohan Jain S., Bhalla-Sarin N., Haploidy in Petunia. In Mohan Jain S., Sopory S.K., Veilleux R.E. (2013). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 5 — Oil, Ornamental and Miscellaneous Plants*, pp. 64, Springer Science & Business Media, B. V. ISBN: 978-90-481-4683-3
31. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant* (1962) **15**, pp. 473–497.
32. Murovec J., Bohanec B. (2012). *Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding*, Dr. Ibromkhim Abdurakhmonov (Ed.), InTech ISBN: 978-953-307-932, Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding/haploids-and-doubled-haploids-in-plant-breeding>
33. Na H., Kim D., Chum Ch. (2011). Effects of Cold Pretreatment and Medium Composition on Anther Culture Initiation in Strawberry, *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29(5)**, pp. 488–493.
34. Ohnoutková a kol. (2019). Barley Anther Culture, *Barley. Methods and Protocol*. Humana Press. Editor Wendy A. Harwood. 1900, pp.37–52.



35. Pierik R. L. M. (1997. *In Vitro Culture of Higher Plants*, pp. 29, Springer, Netherlands. ISBN 978-0-7923-4527-5
36. PubChem. Bethesda (MD), National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004), *PubChem Compound Summary for CID 13077496*, Auxinole; [online]. [cit. 2021-8-5]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Auxinole>
37. PubChem. Bethesda (MD), National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004), *PubChem Compound Summary for CID 235453*, 2-(1H-Indol-3-yl)-4-oxo-4-phenylbutanoic acid; [online]. [cit. 2021-8-5]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-\\_1H-Indol-3-yl\\_-4-oxo-4-phenylbutanoic-acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-_1H-Indol-3-yl_-4-oxo-4-phenylbutanoic-acid)
38. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004). *PubChem Compound Summary for CID 6440982*, Zeatin riboside; [online]. [cit. 2021-8-5 Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zeatin-riboside>
39. UKZÚZ [Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský], Národní odrůdový úřad, *Nově registrované odrůdy* (2011), In Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. [cit. 2021-3-12]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/229544/MakO\\_11.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/229544/MakO_11.pdf)
40. UKZÚZ [Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský], Národní odrůdový úřad, *Nově registrované odrůdy* (2017), In Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. [cit. 2021-3-12]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/527404/MakO\\_2017.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/527404/MakO_2017.pdf)
41. UKZÚZ [Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský], Národní odrůdový úřad, *Nově registrované odrůdy* (2019), In Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. [cit. 2021-3-12]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/618606/MakO\\_2019.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/618606/MakO_2019.pdf)
42. Saad A. I. M., Elshahed A. M. Plant Tissue Culture Media. In Leva A., Rinaldi L. M. R. (2012). *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, pp. 29–31, IntechOpen, London, UK. ISBN 978-953-51-0787-3

43. Sathyanarayana B. N., Verghese D. B. (2007). *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*, pp. 35–37, I. K. International Publishing House, New Delhi, India. ISBN 978-81-898-6611-2
44. Trigiano R. N., Gray D. J. (1999). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, (2nd Edition), pp. 389, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. ISBN 978-08-493-2029-3
45. Tyankova N., Zagorska N. (2008). Factors Affecting *In Vitro* Androgenesis in Cereals, *International Journal of Plant Developmental Biology* **2(1)**, pp. 59–78.

**Seznam příloh:**

Příloha I: Tabulka 16: Indukce androgeneze, donorové rostliny pěstované v polních podmínkách

Příloha II: Tabulka 17: Indukce androgeneze, donorové rostliny pěstovány ve skleníku

**Přílohy:****Příloha I:**

Tabulka 16: Indukce androgeneze, donorové rostliny pěstované v polních podmínkách

Genotyp	Varianta	Velikost poupěte	Velikost prašníků	Indukční médiu	Počet založených prašníků	Počet kalusů
OZ	A1	27	5	MS	53	0
OZ	A2			MS	46	0
OZ	A3			MS	45	1
OZ	B1	31	3	MS	46	7
OZ	B2			MS	53	2
OZ	C1	28	4	MS	46	7
OZ	D1	27	4	MS	40	3
OZ	D2			MS	38	6
ZE	E1	33	3	MS	67	0
ZE	E2			MS	43	0
ZE	F1	30	5	MS	48	0
ZE	F2			MS	39	0
ZE	G1	39	3,5	MS	45	0
ZE	G2			MS	43	0
ZE	H1	40	4	MS	48	0
OZ	I1	25	4	MS	36	11
OZ	I2			MS	43	7
OZ	J1	28	4	MS	45	12
OZ	J2			MS	54	6
OZ	K1	23	3	MS	46	17
OZ	K2			MS	43	13
TI	L1	32	4	MS	47	8
TI	L2			MS	49	0
TI	M1	35	5	MS	39	0
OZ	N1	25	3	MS	58	0
OZ	N2			MS	37	0
OZ	O1	26	3,5	MS	41	5
OZ	O2			MS	38	7
OZ	P1	27	5	MS	40	0
OZ	P2			MS	39	0
OZ	Q1	30	4,5	MS	39	2
OZ	Q2			MS	41	0
OZ	R1	27	4,5	MS	43	0
OZ	R2			MS	35	1
OZ	S1	22	2	MN6	36	0

OZ	T1	25	3	MN6	34	0
OZ	T2			MN6	46	0
OZ	T3			MN6	42	0
OZ	U1	29	4	MN6	35	0
OZ	U2			MN6	36	0
OZ	V1	25	3	MN6	40	0
OZ	V2			MN6	43	0
OZ	W1	25	3	MN6	35	0
OZ	W2			MN6	34	0
OZ	X1	25	3,5	MN6	39	0
OZ	X2			MN6	40	0
OZ	Y1	21	2,5	MN6	27	0
OZ	Z1	24	4	MN6	40	0
OZ	Z2			MN6	37	0
ZE	A 1.1	25	4	MN6	36	0
ZE	A1.2			MN6	31	0
ZE	A2.1	25	3	MN6	30	0
ZE	A2.2			MN6	30	0
TI	B1.1	29	4	MN6	31	0
TI	B1.2			MN6	36	0
				Celkem:	2271	115

**Příloha II:**

Tabulka 17: Indukce androgeneze, donorové rostliny pěstovány ve skleníku

Genotyp	Varianta	Velikost poupěte	Velikost prašníku	Indukční Médium	Počet založených prašníků	Počet kalusů
20/47	1a	24	3	I.	44	0
20/47	1b			II.	45	0
20/47	2a	25	3	I.	32	0
20/47	2b			II.	34	0
20/36	1a	22	2,5	I.	19	0
20/36	1b			II.	21	0
20/36	2a	26	2,5	I.	19	0
20/36	2b			II.	18	0
20/36	3a	22	2,5	I.	21	0
20/36	3b			II.	20	0
20/36	4a	24	2,3	I.	19	0
20/36	4b			II.	20	0
20/42	1a	22	2,5	I.	21	0
20/42	1b			II.	18	0
20/42	2a	24	3	I.	19	0
20/42	2b			II.	19	0
20/42	3a	19	3	I.	18	6
20/42	3b			II.	18	0
20/42	4a	23	4	I.	23	1
20/42	4b			II.	19	0
20/30	1a	22	4	I.	25	8
20/30	1b			II.	20	7
20/30	2a	24	3	I.	25	2
20/30	2b			II.	22	0
20/30	3a	24	4	I.	16	0
20/30	3b			II.	26	1
20/30	4a	27	4	I.	23	0
20/30	4b			II.	18	0
20/52	1a	29	4	I.	39	0
20/52	1b			II.	40	0
20/39	1a	26	4	I.	26	0
20/39	1b			II.	26	0
20/39	2a	30	4,5	I.	23	0
20/39	2b			II.	22	0
20/39	2c			I.	20	0
20/39	2d			II.	20	0
20/40	1a	25	5	I.	21	0

20/40	1b			II.	21	0	
20/40	2a	27	4,5	I.	21	0	
20/40	2b			II.	22	0	
20/40	3a	29	3,5	I.	25	0	
20/40	3b			II.	24	0	
20/42	5a	28	4,5	I.	21	0	
20/42	5b			II.	24	0	
20/42	6a	30	4	I.	25	0	
20/42	6b			II.	20	0	
20/50	1a	25	3	I.	45	8	
20/50	1b			II.	37	0	
20/30	5a	20	3	I.	26	7	
20/30	5b			II.	26	8	
20/30	6a	22	4,5	I.	23	8	
20/30	6b			II.	20	2	
20/30	7a	22	3,5	I.	45	0	
20/30	7b			II.	46	0	
20/30	8a	26	5	I.	35	2	
20/30	8b			II.	34	1	
20/48	1a	20	4	I.	46	0	
20/48	1b			II.	40	0	
20/49	1a	24	4	I.	49	0	
20/49	1b			II.	47	0	
20/36	5	26	3,5	I.	42	0	
20/03	1	18	3	I.	37	0	
20/20	1	21	3	I.	31	0	
20/20	2a	22	3,5	I.	28	0	
20/20	2b			I.	27	6	
20/24	1a	28	4	I.	27	0	
20/24	1b			I.	28	0	
20/42	7	21	3	I.	30	0	
20/52	2	20	3	I.	35	0	
20/53	1	20	3	I.	28	7	
20/53	2	25	4	I.	32	0	
20/54	1a	19	3,5	I.	34	0	
20/54	1b			I.	28	0	
20/54	2a	21	4,5	I.	34	0	
20/54	2b			I.	27	0	
					Celkem:	2069	74

