

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



Androgeneze a její využití pro účely vzdálené hybridizace

bramboru

Bakalářská práce

Autor práce: Eva Suková

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Androgeneze a její využití pro účely vzdálené hybridizace bramboru vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Praze dne: 12. 4. 2016

podpis autora práce:

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za poskytnutí potřebného rostlinného materiálu a za trpělivé vedení, ochotu, pomoc a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce.

Androgeneze a její využití pro účely vzdálené hybridizace bramboru

Souhrn

K významné součásti šlechtitelských programů patří produkce homozygotních linií. Indukovaná androgeneze v prašниковých, pylových a mikrosporových kulturách je považována za nejúčinnější a nejčastěji používanou metodou vhodnou pro tvorbu těchto rostlin. Princip indukované androgeneze spočívá v přeprogramování gametofytické cesty mikrospor na sporofytickou působením fyzikálních nebo chemických faktorů na celé květenství, poupata nebo izolované prašníky.

Základní roli při determinaci androgeneze in vitro hraje genotyp dárcovské rostliny a vývojová fáze pylu. K obvyklým faktorům patří nízká nebo vysoká teplota, centrifugace, vysoká vlhkost, vodní stres, oxidativní stres, osmotický tlak, změna hladiny endogenních růstových látek, přenos prašníků z anaerobního do aerobního prostředí, hladovění, použití kolchicinu, působení těžkých kovů.

Cílem této práce bylo navržení a ověření metodiky pro realizaci indukované androgeneze u brambor. Dosažené výsledky našeho experimentu nejsou jednoznačné a jen naznačují určité trendy a hypotézy. Nejvhodnější poupata pro prašnikovou kulturu mají velikost 2-3 mm. Je vysoce pravděpodobné, že koncentrace sacharózy v MS médiu neměla vliv na indukci kalusů. Na proces indukované androgeneze měl zřejmě největší vliv genotyp testovaných hybridů. Vliv médií bez ohledu na vliv genotypu na tvorbu kalusů byl statisticky prokázán, testování shody četnosti kalusů mezi kombinacemi médií chí-kvadrát testem prokázalo významné rozdíly. Kalusy byly převedeny na regenerační médium, ale k organogenezi zatím nedošlo.

V závislosti na dosažených výsledcích lze konstatovat, že navržená metodika je vhodná minimálně pro odvození kalusů.

Klíčová slova: Brambor, vzdálená hybridizace, androgeneze, prašnikové kultury

Androgenesis and its using for interspecific hybridisation of potato

Summary

The production of homozygous lines has been an important part of breeding programs. The most effective and widely used method suitable for the production of homozygous plants is induced androgenesis via anther, pollen and isolated microspore cultures. The principle of androgenic induction consists in reprogramming microspores from gametophytic to sporophytic development. Physical or chemical factors can be used on the whole inflorescence, flower-buds or isolated anthers for reprogramming. The genotype of donor plant and pollen developmental stage plays a fundamental role in determination of androgenesis *in vitro*. Pre-treatments such as chilling, high temperature, high humidity, centrifugation, water stress, oxidative stress, osmotic pressure change in the level of endogenous growth substances, transfer anthers from anaerobic to aerobic environment, starvation, colchicine application and, heavy metals treatment are other important factors that affect the response of anthers to *in vitro* culture.

The aim of this work was to design and confirm the methodology used for induced androgenesis of potatoes. The achieved results of our experiment showing only trends and hypotheses. The size of the most suitable flower-buds for anther culture is 2-3 mm. It is highly likely that the sucrose concentration in MS medium had no impact on the callus induction. The genotype of tested hybrids probably plays a major role in the induced androgenesis process. The influence of the media on the formation of callus was statistically proven. Calluses were transferred to regeneration medium, but organogenesis has not yet come through.

The results show that the proposed methodology is appropriate to derive calluses at least.

Keywords: Potato, interspecific hybridisation, androgenesis, anther culture

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i>)	10
3.1.1 Biologická charakteristika.....	10
3.1.1.1 Původ.....	10
3.1.1.2 Taxonomická klasifikace.....	10
3.1.2 Biologie, morfologie a fyziologie brambor.....	11
3.1.3 Růst a vývoj	12
3.1.4 Metody používané ve šlechtění bramboru	14
3.2 Explantátové kultury a jejich využití	16
3.2.1 Morfogeneze – regenerace in vitro - přímá a nepřímá.....	16
3.2.1.1 Organogeneze	16
3.2.1.2 Embryogeneze	17
3.2.1.2.1 Zygotická embryogeneze.....	17
3.2.1.2.2 Somatická embryogeneze	17
3.2.1.2.3 Gametofytická embryogeneze	18
3.2.2 Androgeneze	18
3.2.2.1 Vývoj samčího gametofytu (ontogeneze pylu in vivo)	18
3.2.2.2 Přechod od gametofytického ke sporofytickému vývoji.....	19
3.2.2.3 Androgenetická indukce a faktory, které ji ovlivňují.....	20
3.2.2.4 Genotyp, fyziologický stav a podmínky růstu dárcovské rostliny	21
3.2.2.5 Stádium vývoje pylu.....	22
3.2.2.6 Stresové předpůsobení.....	23
3.2.2.7 Povrchová sterilizace poupat a preparace prašníků.....	23
3.2.2.8 Kultivační podmínky	24
3.2.2.8.1 Fyzikální podmínky	24
3.2.2.9 Chemické podmínky kultivace – kultivační média	24
3.2.2.9.1 Růstové regulátory.....	25
3.2.2.10 Regulace androgeneze	26
3.2.3 Androgeneze brambor.....	27
4 Materiál a metody	30

4.1	Rostlinný materiál	30
4.2	Kultivace donorových rostlin.....	30
4.2.1	In vitro kultivace rostlin	30
4.2.2	Ex vitro kultivace rostlin.....	31
4.3	Příprava a kultivace rostlinného materiálu pro androgenezi.....	31
4.3.1	Stanovení vývojové fáze mikrospor / Výběr poupat.....	31
4.3.2	Příprava médií pro kultivaci prašníků	32
4.3.3	Odběr rostlinného materiálu.....	34
4.3.4	Předpůsobení a sterilizace poupat	34
4.3.5	Izolace prašníků	34
4.3.6	Kultivace prašníků	36
4.3.7	Příprava regeneračního média pro indukci organogeneze	36
5	Výsledky	37
5.1	Stanovení vývojového stádia pylových zrn.....	37
5.2	Předpůsobení a sterilizace poupat	37
5.3	Kultivace prašníků	38
5.4	Regenerace kalusů.....	41
6	Diskuze	42
7	Závěr.....	45
8	Přehled citované literatury	46
9	Seznam použitých zkratk.....	52

1 Úvod

Celosvětově patří brambory k nejrozšířenějším kulturním plodinám. Patří k nezastupitelným potravinám, jsou využívány jako surovina pro škrobářenský a lihovarnický průmysl a v některých zemích slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata. Jsou pěstovány na ploše, která zabírá přibližně 19 milionů ha a tím se řadí po kukuřici, pšenici a rýži na čtvrté místo. V současnosti celosvětově největšími pěstiteli brambor z pohledu osázených ploch jsou Asie s 45,9 % a Evropa s 36,5%. Plochy pro pěstování brambor se trvale rozšiřují v Africe a Asii, k poklesu dochází v Evropě a Severní Americe (Vokál, 2013). V České republice plocha osázená bramborami dosahuje přibližně 30 tisíc ha, což je asi 7 procent obdělávané půdy v zemi (Zelená zpráva, 2014).

Šlechtění je tvůrčí činnost využívající všechny dostupné poznatky vědy i praktické zkušenosti šlechtitele. V současnosti k nejzajímavějším šlechtitelským metodám patří ty, při kterých dochází k tvorbě haploidních, případně zdvojených haploidních rostlin (Segui-Simarro, 2010). Přirozené haploidy vznikají v přírodě apomikticky. Guha et Maheshwari (1964) objevili, že haploidní rostliny mohou vznikat pravidelně a v relativně vysokém počtu kultivací nezralých prašníků. Tento objev byl první krokem využití androgeneze pro šlechtění. V samčím genomu jsou obvykle lokalizované geny úrodnosti, odolnosti vůči nemocem a syntézy specifických látek. Vytvoření homozygotních jedinců s těmito posílenými vlastnostmi je žádoucí. Proto se věnuje velká pozornost zjišťování všech podmínek a okolností, které řídí, kontrolují a ovlivňují tento proces (Preťová, 1995).

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo vypracování přehledů poznatků týkajících se problematiky androgeneze u bramboru a výběr metody, kterou bylo možné realizovat v podmínkách katedry genetiky a šlechtění.

Jednotlivé kroky vedoucí ke splnění cíle byly

- zpracování literární rešerše k problematice androgeneze
- převedení vybraných klonů rostlin z *in vitro* do *ex vitro* (ve skleníku)
- založení výsadby na demonstračním pozemku ČZU
- získání optimálních prašníků
- navržení a otestování kultivačních médií pro indukovanou androgenezi prašниковých kultur
- vyhodnocení získaných výsledků.

3 Literární rešerše

3.1 Lilek brambor (*Solanum tuberosum*)

3.1.1 Biologická charakteristika

3.1.1.1 Původ

Za vlast brambor je považována západní část Jižní Ameriky. Území, na kterých rostli předchůdci dnešních brambor, určují dva velké územní okruhy. Větší z nich se rozprostírá od Kolumbie až po Peru na chladnějších náhorních plošinách And v nadmořské výšce 2800-4500 m, druhý leží v teplejších krajích středního Chile (Hawkes, 1990). Domorodci již tehdy znali hodnotu brambor a pěstovali celou řadu jejich odrůd. Brambory byly Inkům hlavní potravou, která je chránila před hladem. Sušené brambory navíc patřily k důležitým předmětům výměnného obchodu mezi zemědělci žijícími v horách a pastevci z nížin (Kutnar, 2005).

Historické dokumenty ukazují na to, že do Evropy se brambory dostaly dvěma cestami, v roce 1570 do Španělska a v letech 1588 – 1593 do Anglie. Cestou, která vedla přes španělskou Sevillu, byl do jižní a střední Evropy přivezen *Solanum andigenum* z Peru. Druhou, severní cestou se do Evropy přes Irsko a Anglii z oblasti Chile dostal druh *Solanum tuberosum*. V Irsku, kde je podnebí podobné jako v Chile se brambory rozšířily velice rychle a přibližně v polovině 17. století se staly polní plodinou. Z Anglie se pak rozšířily do severní Evropy a první emigranti je přivezli i do anglických kolonií v Severní Americe. Tam se staly mateřským zdrojem angloamerické skupiny variet bramboru (Hawkes, 1990).

V Čechách se brambory objevily v první polovině 17. století zásluhou františkánů, kteří je pěstovali v klášterních zahradách. K tomu, aby se staly hospodářsky a sociálně důležitou rostlinou, jim napomohly až často se opakující neúrody, hladová léta 18. století a rychlejší populační rozvoj právě nejnižších lidových vrstev. V druhém a třetím desetiletí 19. století se brambory stávaly cennou surovinou, která slouží nejen ke konzumu a pro krmné účely hospodářských zvířat, ale i k výrobě lihu, škrobu a sirupu (Kutnar, 2005).

3.1.1.2 Taxonomická klasifikace

Jeden z celosvětově nejrozšířenějších zemědělsky využívaných druhů je brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*) patřící do čeledi *Solanaceae* (Hawkes, 1990). Další kulturní plodiny tohoto druhu jsou rajče (*Solanum lycopersicum* syn. *Lycopersicon esculentum*), lilek vejcoplodý

(*Solanum melongena*), různé druhy papriky (*Capsicum*) a tabák (*Nicotiana tabacum*) (Novák et Skalický, 2012).

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Podříše: Vyšší rostliny (*Cormobionta*)

Oddělení: Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: Dvouděložné (*Magnoliopsida*)

Řád: Lilkotvaré (*Solanales*)

Čeleď: Lilkovité (*Solanaceae*)

Rod: Lilek (*Solanum*)

Druh: Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*)

(Zdroj: Novák et Skalický, 2012)

Hawkes (1990) vytvořil klasifikaci rodu *Solanum*, rozlišující 232 druhů, které uspořádal do 21 sérií podle různé úrovně ploidie (diploidní až hexaploidní). Nejrozšířenější sérii tvoří diploidní druhy (73%). Druhou nejrozšířenější jsou tetraploidní druhy (15%), mezi které patří *Solanum tuberosum*. Zbylé série se výskytem pohybují pod hranici 10% (4% tetraploidních, 2% pentaploidních a 6% hexaploidních). V roce 2006 byly tyto druhy zredukovány na 189 druhů včetně 10 dalších druhů, které byly popsány až po roce 1990 (Spooners et al., 2014).

Odrůdy evropského bramboru vznikaly z dovezených jihoamerických druhů *Solanum tuberosum* L. a *Solanum andigenum* Juz. Et Buk, jejich kulturních forem a odrůd (Rybáček, 1988).

3.1.2 Biologie, morfologie a fyziologie brambor

Brambor hlíznatý patří mezi dvouděložné rostliny. Je to vytrvalá jednoletá bylina tvořící hlízy. Hlízy jsou tvořeny mateřskou rostlinou a po vyčerpání zásob v průběhu vegetace odumírají. Společně s hlízami odumírají i všechny nadzemní a podzemní orgány mimo semen a dceřiných (nových) hlíz s živými pupeny. Hlízy jsou bohaté na obsah škrobu, bílkovin, antioxidantů, vitamínů a minerálních látek. Plní funkci zásobního orgánu a jsou důležitým prostředkem pro vegetativní rozmnožování.

Nadzemní soustava je tvořena vegetativními orgány (listy, stonky a pupeny) a generativními orgány (květy a plody), které tvoří nať bramborového trsu. Charakter nadzemní části trsu je ovlivněn tvarem a typem natě, počtem a výškou stonků a hustotou olistění (Rybáček,

1988). Dle mezinárodní klasifikace rozlišujeme stonkový a listový typ. Tvar trsu může být zarovnaný, kuželovitý nebo deštníkovitý. U jednotlivých odrůd se může výška a tloušťka stonku lišit, přesto je pro všechny společným charakteristickým znakem křídlení, tj. vyrůstání hran. List je přetrhovaně lichozpeřený a ochmýřený. Skládá se z řapíku, který je prodloužený ve vřeteně, z něhož vyrůstají lístky, lístečky, palisty a palísky. Lichý lístek na vrcholu řapíku se označuje jako koncový (Vokál, 2013).

Generativní orgány jsou sdruženy ve dvouvijanovém květenství, které se vytváří na vrcholu stonku. Květ je složený z pěti kališních lístků, pěti korunních lístků, pěti tyčinek a pestíku. Kališní lístky jsou asi do jedné třetiny srostlé v kalich, pak jsou volné. Jsou zeleně zbarvené. Korunní lístky jsou srostlé v korunu tak, že pouze jejich zahrocené vrcholy zůstávají volné. Celá koruna je zbarvena bíle nebo v odstínech modrofialové. Různé zbarvení je typickým odrůdovým znakem a je nejméně ovlivněno prostředím.

Čnělka ukončená ve vrcholu paličkovou bliznou přechází naspodu v baňkovitý, svrchní dvoupouzdrý semeník s vajíčky uloženými koncentricky v placentě.

Tyčinky jsou kuželovitě seskupeny kolem čnělky. Každá tyčinka se skládá z krátké nitky a dvoupouzdrého prašníku. Prašníky jsou žluté nebo oranžové, kuželovité, pravidelné, zahnuté, deformované nebo nepravidelné. Dozrálé prašníky na vrcholu pukají a tím se uvolní pyl.

Plod je kulatá nebo oválná dvojpouzdrá bobule obsahující 50 – 100 semen (Rybáček, 1988).

Kořenová soustava je u semenáčů složena ze dvou částí. Ze zárodečného kořínku se vytváří křlový kořen prvotní kořenové soustavy s bohatě rozvětvenými postranními kořeny. Teprve později se z podzemní části stonku a ze stolonů vytvářejí adventivní kořeny.

Kořenová soustava rostlin množných hlízami je tvořena bohatě se větvicemi stonkovými a stolonovými kořeny. Stolony jsou podzemní výhony a svojí stavbou a uspořádáním pupenů si zachovávají charakter stonku s listy redukovanými na šupiny.

Hlíza je zkrácený modifikovaný vzrostlý vrchol stolonu. Část hlízy, která souvisí se stolonem, se označuje jako pupková. Má méně oček než protilehlá část hlízy, známá pod názvem korunková část. Na hlíze se nachází obvykle 12 spících oček s několika spícími pupeny. Genotypově má hlíza specifický tvar (Vokál, 2013).

3.1.3 Růst a vývoj

Růst je charakteristickým projevem živých organismů. Rozumíme jím nevratné přibývání hmoty nebo velikosti spojené s činností živé protoplazmy. Růst je ale také neoddělitelně propojen s diferenciací, procesem, při kterém se utvářejí jednotlivá pletiva a orgány rostlinného

těla změnou původních meristemických buněk na buňky specializované. Vývoj rostlin (ontogeneze) lze členit do 4 hlavních etap: embryonální, juvenilní, zralost a stárnutí (Procházka et al., 1998).

Individuální vývoj vegetativně množného bramboru se shoduje s průběhem ontogeneze jednoletých rostlin, které lze rozdělit do dvou period lišících se zejména způsobem výživy, a to na periodu kryptovegetace (skryté vegetace) a periodu vegetace. V periodě vegetace zelené části rostliny fotosyntetizují a tím rostlina přechází na autotrofní způsob výživy. Univerzálně použitelný kódovací systém, který dovoluje zakódovat jednotlivá vývojová stádia jedno- a dvouděložných rostlin, byl popsán pracovníky z ústavu BBA, BSA a IVA a jako „BBCH stupnice“. K této všeobecné kódovací stupnici představil Hack et al. (1993) stupnici pro brambory, která je odvozena ve shodě s obecným schématem.

Dle Rybáčka (1988) lze vývojová stádia rostlin brambor rozdělit na základě osmi nadzemních fenologických termínů na sedm hlavních stádií (makrostádií). Jsou to klíčení, vývoj listů a stonků, tvorba květenství, kvetení, vývoj bobulí, zrání plodů a semen, stárnutí/ odumírání. Toto členění umožňuje porovnání s vývojem podzemní části trsu, tvorba hlíz probíhá průběžně od stádia tvorby květenství až po stádium stárnutí/ odumírání.

Tvorba květu spojená s přechodem rostlin z vegetativní do reprodukční fáze představuje nejvýznamnější vývojovou změnu. Signálem pro to může být suma nízkých teplot určitého rozmezí (jarovizace) nebo změna délky dne (fotoperiodická indukce kvetení). Dle fotoperiodické indukce kvetení lze rostliny rozdělit na neutrální, tj. bez fotoperiodického požadavku a na fotoperiodicky citlivé, vyžadující pro indukci kvetení určitou délku fotoperiody (Procházka et al., 1998).

Specifické pro brambor (*Solanum tuberosum*) je, že z hlediska tvorby květů se jedná o dlouhodobou rostlinu a z hlediska tvorby hlíz krátkodobou. Dlouhý den brzdí dlouhý růst klíčků, podporuje růst vzešlých rostlin a neovlivňuje počet stonků. Podporuje také zakvétání a prodlužuje délku vegetační doby. Na druhou stranu, opožděje nasazování hlíz, které jsou ale vlivem zvýšené asimilace vyrovnanější, mají vyšší hmotnost a škrobnatost. Krátký den podporuje růst klíčků do délky, po vzejití brzdí růst natě, potlačuje počátek květu, podporuje opad pupat, zkracuje vegetační dobu, forma listů je nevýrazná a později jsou chlorotické. Stolony jsou kratší a hlízy se nasazují dříve, takže jejich hmotnost je zpočátku sice větší, ale později menší, stejně jako škrobnatost. Bylo zjištěno, že vysokou kritickou délkou dne se vyznačují velmi rané a rané odrůdy (15-16 hodin), nižší kritickou délkou dne mají polorané odrůdy (14 – 15 hodin) a nízkou pozdní odrůdy (13 – 14 hodin) Hruška (1974).

Dalším důležitým vnějším faktorem ovlivňujícím růst a vývin rostlin související s délkou dne je teplota (Procházka et al., 1998). Brambory jsou ke změnám teploty citlivé. Za optimální teplotu pro klíčení hlíz se považuje 15 – 20°C. Nať začíná růst při teplotě 5- 6 °C a nejrychleji roste při 20 – 25°C. Při teplotě nad 30°C se růst zastavuje a 40°C a vyšší způsobuje poškození pletiv nadzemních částí rostlin. I odolnost bramborové natě vůči nízkým teplotám je malá. Při déle trvajících teplotách -1 až -1,5°C nať zmrzne. Toto nebezpečí nastává zejména u raných odrůd při pozdních jarních mrazech (Vokál et al., 2004).

3.1.4 Metody používané ve šlechtění bramboru

Významným jevem využitelným v procesu šlechtění byl objev pohlavnosti rostlin R. J. Camerariem (1694) a později zjištění možnosti záměrného přenosu pylu. První křížence tabáku, i mezidruhové, vytvořil J. G. Kolreuter (1760) a upozornil tak na význam hybridizace (Rod, 1982).

První informace o moderním šlechtění brambor pocházejí z Anglie, z roku 1807, kde byla provedena hybridizace odrůd umělým opylením. V Evropě i Americe bylo běžné pěstování semenáčků ze semen pocházejících z nasazených plodů. Metodou hromadného výběru byla v druhé polovině 19. století vyšlechtěna řada nových odrůd. Ve 20. století se ve šlechtění kulturních odrůd brambor začaly využívat plané odrůdy pocházející ze Střední a Jižní Ameriky, jako vhodné zdroje genů resistance k nemocem a škůdcům (Bradshaw et Mackey, 1994).

Základním opatřením v novošlechtění brambor je křížení, proto se jako rodiče vybírají především odrůdy, které dobře kvetou a jejich pyl je fertilní (Zadina et Jermoljev, 1976). Vzhledem k sexuální neslučitelnosti mezi planými a kulturně pěstovanými druhy bramboru vypěstování nové odrůdy tradičními šlechtitelskými metodami obvykle trvá 15-20 let. Využitím moderních biotechnologických metod založených na principu manipulace na úrovni izolovaných buněk lze tento proces nejen zrychlit, ale také snížit výrobní náklady a dopad na životní prostředí. Nespornou výhodou je, že do šlechtěné odrůdy jsou „vnášeny“ geny požadovaných vlastností a je omezeno „zavlečení“ nevhodných genů (Halterman et al., 2015).

Vhodným objektem pro experimentální práci šlechtitele jsou sporofyty s gametickým počtem chromozomů – haploidy (Novák, 1990).

Haploidizace

Schopnost produkce haploidů je založena dědičně. Geny podmiňující vznik haploidů jsou přenášeny pylem otcovské rostliny a zabraňují splynutí gamet. Haploidní jedinci mohou

vzniknout buď tzv. haploidní partenogenezí nebo apogametií. Vývoj embrya z neoplozené samičí gamety se nazývá gynogeneze a z neoplozené samčí gamety androgeneze. Při apogametií embrya vzniká z jiné buňky než ze samičí gamety (Zadina et Jermoljev, 1976).

Frekvence spontánního vzniku haploidů je velmi nízká, proto pro účely šlechtění je tvorba haploidů vyvolávána uměle (Germana, 2010) a haploidní rostliny se využívají zejména ve šlechtění obilovin nebo brambor (Novák, 1990).

V podmínkách *in vivo* se využívají modifikované metody opylování (kastrace a izolace, opožděné opylování, opylení inaktivovaným pylem, vzdálená hybridizace) (Germana, 2010). Haploidy brambor lze získat především opylením odrůd *Solanum tuberosum* pylem některých diploidních druhů, zejména *Solanum phureja*, *Solanum rybinii*, *Solanum Boyacense* aj. (Zadina et Jermoljev, 1976).

V 80. letech byly nalezeny zákonitosti determinující vývoj haploidů *in vitro* (Novák, 1990). Za nejúčinnější a nejčastěji používanou metodou je považována indukovaná androgeneze v prašниковých, pylových a mikrospоровých kulturách (Germana, 2010).

Využití haploidního materiálu spočívá hlavně v rychlém zisku šlechtitelského materiálu s vysokou homozygotností. Haploidní metoda také umožňuje křížení kulturních brambor s planými druhy na stejné úrovni ploidie (Hougas et Peloquin, 1960). Křížení dihaploidů s tetraploidy poskytlo u některých kombinací vysoce výkonné potomstvo, což je považováno za obdobu heterózního efektu (Mendiburu et al., 1974).

Polyplodie

Cílem polyplodizace u brambor je převedení haploidního materiálu na dihaploidní (tzn. převedení diploidních druhů ($2n=24$) na tetraploidní ($4n=48$)) za účelem křížení planých druhů s odrůdami *Solanum tuberosum*. Díky polyplodii se pro křížení začaly používat vzdálené druhy s geny imunity proti chorobám a škůdcům bramboru např. *S. acaule*, *S. stoloniferum*, *S. polyadenium*, *S. verrucosum*, *S. pinnatisectum*, *S. vernei*. Polyplodií lze také odstranit sterilitu mezidruhových hybridů. Zdvojením počtu chromozomů sterilního hybridu se dvěma nehomologními genomy se dosáhne normální plodnosti (Zadina et Jermoljev, 1976).

K produkci polyploidů se používá kolchicin, který ochromí činnost dělicího vřeténka nebo zabráni jeho vzniku. Tím dochází k poruše normálního dělení, což se projevuje v nestejně distribuci chromozomů k pólům v anafázi mitózy. Nedávné technologické inovace a lepší pochopení základních kontrolních mechanismů přineslo oživení zájmu o produkci haploidů u vyšších rostlin (Forster et al., 2007).

Při produkci polyploidů u brambor je potřeba vycházet z toho, že účinek kolchicinu se projevuje pouze na dělicích se buňkách, a proto se používají na klíčící semena, semenáčky, mladé výhonky, klíčky apod. (Zadina et Jermoljev, 1976).

3.2 Explantátové kultury a jejich využití

Rostlinná somatická buňka je totipotentní, tzn. obsahuje kompletní genetickou informaci k vývoji celistvého organismu a za určitých podmínek může zregenerovat v celou rostlinu. Technika explantátových kultur patří mezi biotechnologické metody využívající tuto vlastnost rostlinných buněk. Je založena na předpokladu, že kultivací izolovaných částí rostlin (např. buněk, pletiv nebo orgánů) ve sterilních podmínkách lze získat celistvou rostlinu (Novák, 1990).

Diferencovaná plnohodnotná buňka může projevit svoji totipotenci pouze tehdy, když dojde k její dediferenciaci. To znamená, že se musí vrátit strukturálně i funkčně na úroveň zygoty, buňky embryonální nebo meristematické. Buněčné organely se zjednodušují a obnovuje se dělení, které musí být organizované, a musí být nastolena buněčná a posléze orgánová polarita. Není-li tomu tak, vzniká pouze kalus (Procházka et al., 1998).

Genetická i fyziologická manipulace s vyššími rostlinami na úrovni izolovaných buněk, pletiv a orgánů patří od 80. let 20. století k jedné z nejslibnějších oblastí zemědělské biotechnologie (Novák, 1990).

3.2.1 Morfogeneze – regenerace *in vitro* - přímá a nepřímá

Pod pojmem morfogeneze se rozumí vytváření organizovaných struktur a v oblasti explantátových kultur se jako synonymum používá pojem regenerace. V podmínkách *in vitro* mohou regenerovat různé struktury buď ze základů, které již byly založeny na donorové rostlině, nebo se základy vytvářejí teprve během kultivace (regenerace *de novo*). V obou případech se jedná o přímou regeneraci. V případě, že dělením meristematických buněk vzniká nejprve kalus a teprve po změně kultivačních podmínek dochází k regeneraci nových struktur, hovoříme o nepřímé regeneraci.

Morfogeneze či regenerace probíhá v podmínkách *in vitro* buď jako organogeneze nebo embryogeneze (Procházka et al., 1998).

3.2.1.1 Organogeneze

Organogenezi lze popsat jako proces, při kterém vznikají jednotlivé rostlinné orgány (kořen, prýt, list, květ) nebo jejich soubory. U druhů, kde se orgány tvoří za normálních

podmínek, lze navodit i vznik zásobních orgánů - cibulí a hlíz. Protože regenerované zásobní orgány usnadňují přenos do normálních podmínek, je této otázce věnovaná pozornost. Například u lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.) vznikají mikrohlízky přímo z axilárních pupenů (Procházka et al., 1998).

Při organogenezi se nová struktura může vyvíjet z jedné somatické buňky nebo z několika vzájemně prostorově a funkčně komunikujících buněk. Díky tomu existuje při nepřímé organogenezi riziko vzniku genetických chimér (Novák, 1990).

Na průběh organogeneze mají vliv kultivační podmínky a složení kultivačních médií. Skoog et Miller (1957) uvádějí přímou závislost průběhu organogeneze na poměru, v jakém jsou v médiu zastoupeny cytokininy a auxiny. Je-li tento poměr přibližně jedna, dochází u primárních explantátů k tvorbě neorganizovaného kalusu. Je-li poměr větší než jedna, tj. převažují-li cytokininy nad auxiny, dochází k regeneraci prýtů. Při opačném poměru se regenerují kořeny. To platí pro regeneraci přímou i nepřímou.

I když při organogenezi nevzniká celistvá rostlina bezprostředně, je k ní možné dospět dalšími manipulacemi, např. změnou kultivačních podmínek nebo přenesením na jiné kultivační médium (Procházka et al., 1998).

3.2.1.2 Embryogeneze

Embryogeneze se vyvinula jako úspěšná strategie pro reprodukci vyšších mnohobuněčných organismů. V normálních podmínkách po splynutí samčí a samičí pohlavní buňky v diploidní zygotu se dělením začne vyvíjet zárodek, který je uložen v semeni. Základem embrya nemusí být vždy zygota a zárodky se mohou vyvíjet i bez oplození, apomikticky (Novák et Skalický, 2012).

U vyšších rostlin lze podle toho, které buňky jsou základem embrya, rozlišovat embryogenezi zygotickou, embryogenezi gametofytickou a somatickou. V umělých podmínkách kultivace se mohou embrya vyvíjet všemi způsoby (Maraschin, 2005).

3.2.1.2.1 Zygotická embryogeneze

Základem vyvíjejícího se embrya při zygotické embryogenezi je zygota, která vznikla buď před, nebo po izolaci explantátu (Procházka et al., 1998).

3.2.1.2.2 Somatická embryogeneze

Při somatické embryogenezi se zárodek vyvíjí ze somatických buněk. V přirozených podmínkách u krytosemenných rostlin to mohou být buňky diploidních pletiv vajíčka

a výjimečně i z buněk listů. V rostlinných explantátových kulturách se pro somatickou embryogenezi využívají struktury, které mohou pocházet z jakékoli části rostlinného organismu.

Na rozdíl od zygotické a gametofytické embryogeneze jde v tomto případě o regeneraci nepřímou. Přímá regenerace je ojedinělá, příkladem může být vznik somatických embryí z buněk pokožky (Procházka et al., 1998).

3.2.1.2.3 Gametofytická embryogeneze

Embryogenezi lze vyvolat *in vitro* i u některých buněk gametofytu. U semenných rostlin se rozděluje podle toho, ze kterých buněk gametofytu embryo vzniklo, a to na gynogenezi a androgenezi (Procházka et al., 1998).

Gynogeneze

Při gynogenezi dochází k vývoji embrya bez opylení ze samičích buněk. Jako explantáty se používají celé pestíky nebo jejich části nebo samotná vajíčka.

Androgeneze

Při androgenezi se embryo apomikticky vyvíjí v samčích pohlavních orgánech, v tyčinkách. Detailně je proces androgeneze rozvedený v kapitole 3.2.2.

3.2.2 Androgeneze

V procesu mikrosporogeneze dochází ke tvorbě mikrospor nebo také samčích haploidních výtrusů. Ty se dále mitoticky dělí a následně diferencují do dvou až třibuněčných pylových zrn. V případě, že z nějakého důvodu dojde k zastavení vývoje pylu a mikrospora se začne vyvíjet somaticky, mluvíme o androgenezi (Datta, 2005).

3.2.2.1 Vývoj samčího gametofytu (ontogeneze pylu *in vivo*)

Samčím pohlavním orgánem v květu je tyčinka (mikrosporofyl), která je u většiny krytosemenných rostlin tvořena nitkou, konektivem a prašníkem. Soubor tyčinek v jednom květu vytváří andreceum. Nitka (filamentum) je obvykle jednožilná. Konektiv (spojidlo) je pletivo spojující dva prašné vázky. Je pokračováním nitky v prašníku. Prašník (anthera) sestává ze dvou prašných váček (mikrosynangií), kde každý z nich obsahuje dvě prašná pouzdra (mikrosporangia). V prašných pouzdrech jsou pylová zrna (pyl), která jsou dvoubuněčná nebo trojbuněčná a obvykle mají tvar kulovitý nebo elipsoidní (Novák et Skalický, 2012).

V časných stádiích ontogeneze je prašník tvořen homogenními buňkami obalenými pokožkou. V dalším vývoji se pod pokožkou diferenciují základy velkobuněčného pletiva – samčího archesporu, jehož dělením vzniká vnější vrstva parietálních buněk a vnitřní vrstva buněk sporogenních. Dělením parietálních buněk se vytváří několik vrstev tvořících stěny mikrosporangí a směrem dovnitř výstelková vrstva (tapetum). Ze sporogenních buněk tapeta vznikají po několika mitotických děleních mateřské buňky pylových zrn (Novák et Skalický, 2012).

Novák (1990) vývoj samčího gametofytu u vyšších rostlin rozděluje do třech fází:

- i. Meióza, jejímž výsledkem jsou pylové tetrády haploidních mikrospor
- ii. Uvolnění mikrospor ze společné kalózové stěny mateřské tetrády
- iii. Vývoj mikrospory v dospělé pylové zrno, charakterizovaný první, resp. i druhou pylovou mitózou, jejímž výsledkem je dvou, resp. trojbuněčná gameta obsahující vegetativní i generativní buňky.

Proces, ve kterém meiózou vznikají haploidní mikrospory, je dle Nováka et Skalického (2012) definován jako mikrosporogeneze.

První pylová mitóza je asymetrická a při cytokinezi jsou vytvořeny dvě nerovnocenné buňky, menší rozmnožovací (generativní) a větší láčková (vegetativní). Láčková buňka, která obklopuje generativní buňku, vytváří pylovou láčku, nezbytnou pro přenos spermatické buňky k vajíčku. Poté, co se generativní buňka mitoticky rozdělí na dvě spermatické buňky (samčí gamety), se pylové zrno stává dospělým samčím gametofytem (Campbell et Reece, 2006). K tomuto dělení generativní buňky dochází u 70 % rostlinných druhů (např. čeleď *Solanaceae* a *Liliaceae*) v průběhu růstu pylové láčky, u jiných druhů (čeleď *Poaceae* a *Brassicaceae*) ještě před vytvořením pylové láčky (McCormick, 1993).

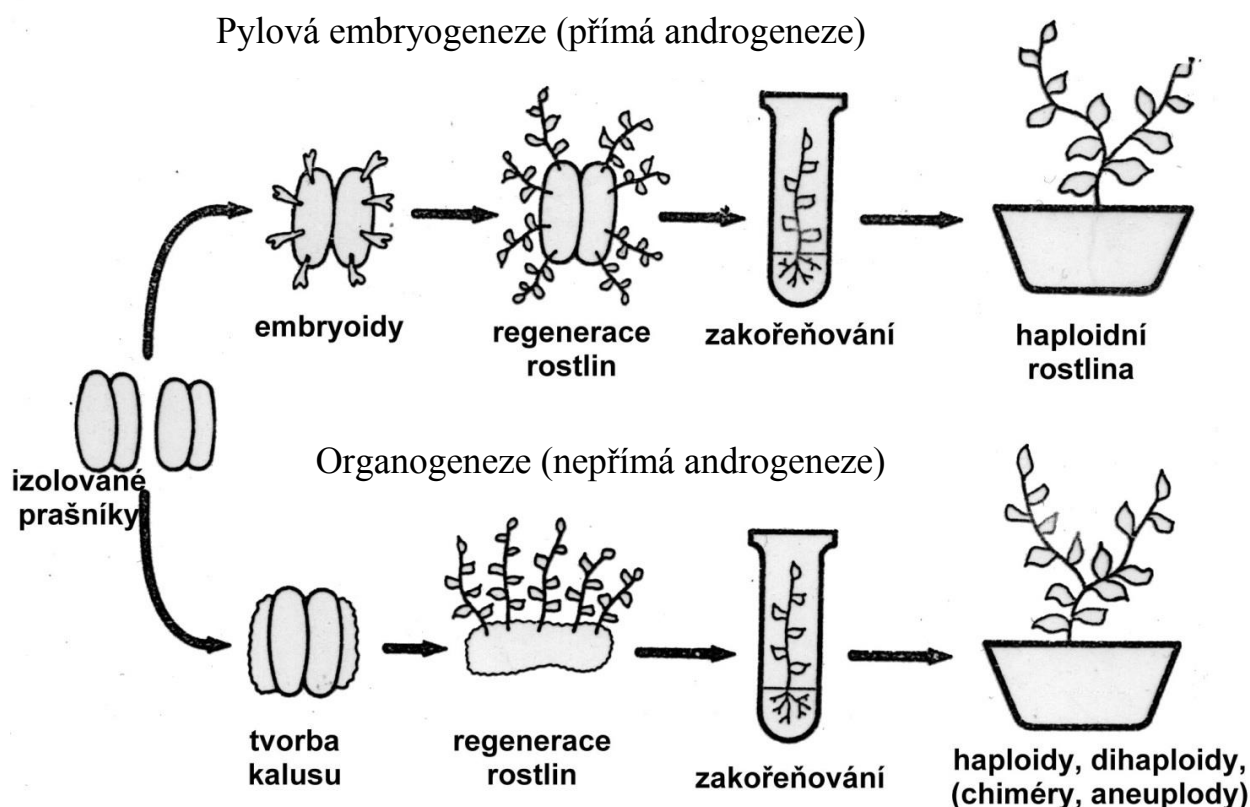
3.2.2.2 Přejít od gametofytického ke sporofytickému vývoji

Vývoj mikrospor je u různých druhů modifikován, zejména pokud jde o polohu jádra při první pylové mitóze a cytoplazmatickou syntézu v raném stádiu vývoje vegetativní buňky. Lze předpokládat, že embryogenní mikrospory vznikají chybnými procesy v mikrosporogenezi. Jde zejména o poruchy při tvorbě a polarizaci pylových tetrad, vedoucí ke vzniku mikrospor s několika jádry. Abnormality ve vývoji pylu jsou příčinou pylového dimorfizmu *in vivo*. Vyskytuje se spontánně, např. u některých mezidruhových hybridů *Solanum* byly v prašném pouzdře *in situ* pozorovány vícebuněčné struktury připomínající pylové embryoidy (Ramanna, 1974).

Princip indukované androgeneze, nebo-li pylové embryogeneze *in vitro*, je obdobný jako u pylového dimorfizmu *in vivo*. Vytvoření haploidů z mikrospor v podmínkách *in vitro* probíhá buď přímo, přes stádia klasické zygotické embryogeneze, nebo nepřímo, kdy se pylové buňky opakovaně dělí a vytvářejí nediferenciovaný kalus (Datta, 2005; Asakaviciute, 2008).

Kalus po přenesení na diferenciační médium regeneruje v rostliny různého stupně ploidie. U těchto rostlin je vyšší cytologická heterogenita než u rostlin získaných přímou pylovou embryogenezí (Novák, 1990). Schematické znázornění vývoje mikrospor při pylové embryogenezi nebo organogenezi prýtlů v haploidním kalusovém pletivu je na obrázku 1.

Obrázek 1. Vývoj mikrospor



Převzato a upraveno dle Novák, 1990

3.2.2.3 Androgenetická indukce a faktory, které ji ovlivňují

Umělé kultivační podmínky, ve kterých jsou kultivovány explantáty, prašníky nebo pylová zrna, změni směr vývoje mikrospor. Výsledkem jsou haploidní struktury, které se mohou

po spontánním nebo indukovaném zdvojení chromozomů vyvíjet do dihaploidních zárodků (Procházka et al., 1998).

Maraschin et al. (2005) proces androgeneze *in vitro* popsal těmito třemi hlavními fázemi:

- i. Vlivem stresových faktorů dochází k potlačení gametofytického vývoje a dediferenciaci buněk
- ii. Probíhá buněčné dělení a vytvářejí se mnohobuněčné struktury
- iii. Jsou generována embrya nebo kalusy.

Pro realizaci procesu indukované androgeneze *in vitro* jsou využívány dvě hlavní techniky. Jsou to prašníkové nebo pylové kultury. Technika prašníkových kultur je jednodušší (Preťová, 1995). Používají se při ní celé prašníky sterilně vypreparované z pupat ve vhodném vývojovém stádiu, které se pokládají na povrch pevného média nebo plavou na povrchu tekutého média. K hlavním nevýhodám kultivace celých prašníků je možnost vzniku rostlin nejen z mikrospor, ale i ze somatických pletiv, což znamená produkci rostlin různého stupně ploidie (Novák, 1990). Z hlediska uplatnění různých biotechnologických přístupů ve šlechtění je preferovanější technika pylových kultur (Preťová, 1995).

Přechod mezi prašníkovou a pylovou kulturou představuje tzv. sériová kultivace prašníků v tekutém médiu, kdy prašníky na povrchu tekutého média praskají a postupně při přenosu do čerstvého média uvolňují embryogenní mikrospory, které se vyvíjejí v haploidní embryoidy (Novák, 1990). Pro svůj jednobuněčný původ při regeneraci androgenních rostlin se mikrosporová kultura přednostně využívá při pokusech s rekombinantní DNA (Preťová, 1995).

Pylové kultury vycházejí ze suspenze pylu v tekutém médiu, při kultivaci pylu izolovaného z čerstvých prašníků dochází ke vzniku embryoidů pouze ojediněle (Novák, 1990).

Proces pylové embryogeneze ovlivňují četné endogenní i exogenní faktory, zahrnující genotyp, fyziologický stav a podmínky růstu dárcovské rostliny, stádium vývoje pylu při inokulaci, stresové předpůsobení květních pupenů nebo prašníků, kultivační podmínky, případně sezonní vlivy při založení kultury (Sopory et Bajaj 1987; Preťová, 1995; Atanassov et al., 1995; Wang et al., 2000; Datta, 2005; Asacaviciute, 2008).

3.2.2.4 Genotyp, fyziologický stav a podmínky růstu dárcovské rostliny

Genotyp rostliny, ze které je odvozena prašníková nebo pylová kultura, hraje základní roli při determinaci androgeneze *in vitro*. Při průzkumu 25 kultivarů *Nicotiana tabacum* byly androgenní rostliny získány u všech testovaných kultivarů s výjimkou jednoho. V testovaném souboru byly nalezeny významné rozdíly v počtu regenerantů na embryogenní prašník a ve

frekvenci embryogenních prašníků. Kauzální komponenta variance, podmíněna genotypem tvořila 98,6 % z celkové proměnlivosti znaku (Novák et Vyskot, 1974).

Existují různé studie o tom, jak fyziologický stav dárcovské rostliny může ovlivnit odezvu (response) prašníků při kultivaci *in vitro*. Například Rashid et Street (1973) zjistili, že frekvence androgeneze u rulíku zlomocného je vyšší v prašnicích odebíraných na začátku kvetení a klesá se stářím rostliny. Vliv teploty, fotoperioda a intenzita světla při pěstování dárcovských rostlin na indukci androgeneze byl pozorován u tabáku (Dunwell, 1976). Přesto nelze tento parametr standardizovat (Germana, 2009).

3.2.2.5 Stádium vývoje pylu

Mikrospory obsahují kompletní genetickou výbavu pro vývoj celého organismu. Androgenní embrya vznikají přímo dělením mikrospory nebo nepřímo z haploidního kalusu. Experimentálně bylo prokázáno, že k přechodu pylových zrn od gametofytického ke sporofytickému vývoji dochází jen v určitém velmi krátkém časovém úseku (Nitch et Nitch, 1969). Později bylo toto stadium přesněji definované, a to v období mezi etapami jednojaderné a dvojjaderné mikrospory. Nejlepší výsledky byly dosaženy těsně před první pylovou mitózou nebo těsně po ní. Bylo zjištěno (i u brambor), že délka květních pupat přímo koreluje s vývojovým stádiem pylu (Preťová, 1995).

Výsledky práce Touraev et al. (1996) prokázaly vliv stresového ošetření mikrospor u *Nicotiana tabacum* na odchýlení se pylových zrn od běžného gametofytického vývoje k alternativnímu sporofytickému. Binarova et al. (1977) zjistili, že k embryogenezi u *Brassica napus* může dojít i u pylu v pozdním dvoujaderném stádiu poté, co je krátkodobě vystaven teplotě 41°C. Sopory et Munshi (1996) ve své studii zjistili, že rostliny získané z pylu v jednojaderné fázi, byly většinou haploidy, zatímco rostliny s vyšším počtem chromozomů vznikaly spíše z prašníků v pozdějších fázích.

Stadium vývoje pylu se obvykle testuje metodou acetokarmínovou (Sharma et Sharma, 1972). U odrůd, u kterých je prováděná pylová embryogeneze, se natrhají poupata z různých trsů a v různých vývojových fázích. Z nich se postupně vypreparovávají prašníky. Na jedno podložní sklíčko se dá jeden prašník, který se rozmáčkne, zakápně roztokem acetokarmínu (1% acetokarmínu ve 45% kyselině octové) a přikryje se krycím sklíčkem. Takto připravený preparát lze pozorovat pod optickým mikroskopem a lze z něho určit fázi vývoje pylu. Pro fluorescenční barvení může být použito také DAPI (Germana et al., 2011).

3.2.2.6 Stresové předpůsobení

Působením fyzikálních nebo chemických stresových faktorů na celé květenství, poupata nebo vypreparované prašníky může mít pozitivní vliv na účinnost androgenese. Obvyklé faktory, při kterých dochází u mikrospor k potlačení gametofytického vývoje a zahájení alternativní sporofytní cesty, jsou nízká nebo vysoká teplota, centrifugace, vysoká vlhkost, vodní stres, oxidativní stres, osmotický tlak, změna hladiny endogenních růstových látek, přenos prašníků z anaerobního do aerobního prostředí, hladovění, elektrostimulace, použití kolchicinu, působení těžkých kovů a další (Islam et Tuteja, 2012). Za nejznámější a obvykle nejúčinnější bývá považován teplotní šok (Zur et al., 2008). Nároky na rozsah teploty i dobu působení chladem jsou u různých druhů a různých typů kultivace velmi rozdílné a musí být stanoveny experimentálně (Bajaj et al. 1987). Sunderland et Huang (1987) na základě cytologického pozorování vyslovili domněnku, že mikrospory nejsou až do stádia prvního mitotického dělení plně determinované pro gametický vývoj. Změnou podmínek prostředí lze indukovat vývoj ve směru tvorby embrya.

Zvýšená či snížená teplota může významně ovlivnit androgenezi u řady druhů a to buď působením před odběrem na poupata či květy nebo přímo na izolované prašníky (Biddington et Robinson, 1991). Většinou se doporučuje předpůsobení chladem, i když přímé ošetření izolovaných prašníků se jeví méně účinné než ošetření poupat nebo květů před odběrem (Sunderland et Wilson 1979).

3.2.2.7 Povrchová sterilizace poupat a preparace prašníků

Z povrchu poupat ještě před preparací prašníku je nutné odstranit nečistoty (bakterie a plísně), sterilizovat je. Obvykle se pro povrchovou sterilizaci květních pupenů používá následující postup

- neotevřená poupata jsou ponořena na několik minut do 70% roztoku ethanolu
- poté jsou na 10-15 minut ponořena do roztoku chlornanu sodného (1,5% aktivního chlóru ve vodě) obsahujícím několik kapek Tween 20
- nakonec jsou nejméně třikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou (po dobu 5 min).

Po sterilizaci jsou prašníky z poupat asepticky vypreparovány a umístěny na médium. Existuje mnoho sterilizačních protokolů, většina z nich se nachází v manuálu pro produkci zdvojených haploidů od Maluszynski et al. (2003).

3.2.2.8 Kultivační podmínky

Pro dobrý růst a vývoj explantátu je potřeba zajistit dobré kultivační podmínky a to jak fyzikální tak i chemické. Fyzikální podmínky zahrnují světlo, teplo a také plynnou fázi kultivačního prostředí, tzn. množství vodní páry a zvýšený či snížený obsah některých plynů. Chemické podmínky zahrnují kultivační médium, jako zdroj výživy, energie a regulačních látek (Procházka et al., 1997).

3.2.2.8.1 Fyzikální podmínky

Teplota a světlo ovlivňují explantátovou kulturu modifikováním nejrůznějších biochemických a fyziologických procesů, včetně metabolismu růstových regulátorů (Biddington et Robinson, 1991). Nissen et Sutter (1990) uvádějí, že světlo může způsobovat degradaci rostlinných hormonů, konkrétně IAA a IBA v kultivačním médiu tuhém i tekutém. Huxter et al. (1979) zaznamenali, že pletiva tabáku, která byla kultivována ve tmě, produkují více ethylenu než pletiva rostoucí na světle.

3.2.2.9 Chemické podmínky kultivace – kultivační média

Kultivační média používaná v pylové embryogenezi skýtají nejen výživové hodnoty, ale podílejí se i na regulaci vývoje mikrospory do embrya. Pro úspěšnou indukci androgenese je velice důležité správné složení média a zachování vyváženého pH. Médium pro rostlinné buňky musí být komplexní, stanovení jeho optimálního složení závisí na druhu rostliny (Datta, 2005).

Celá kultivace může proběhnout na médiích, kde se po celou dobu výchozí obsah rostlinných hormonů nemění. Častěji se ale obsah média v průběhu kultivace mění a to kvalitativně i kvantitativně. V průběhu kultivace je také možný přenos na jiné médium. Jiné je složení média pro indukci kalusů, jiné pro jeho vlastní kultivaci, jiné pro vyvolání regenerace a jiné pro získání plnohodnotných rostlin (Procházka et al., 1997).

Pro prašnickové kultury byla použita celá řada médií, běžně používaných pro explantátové kultury. Různí autoři použili vlastní modifikace kultivačních médií, a proto nelze mluvit o určitém standardním médiu podporující androgenezi. Nejčastěji používaná média jsou Murashige and Skoog (1962), N6 (Chu 1978) a jejich variace (Preřová, 1995). Jako další lze jmenovat B5 médium (Gamborg et al., 1968), SH médium (Schenk et Hildebrandt, 1972) a další. Při testování jednotlivých složek se zjistilo, že klíčovým faktorem pro indukci androgenese je sacharóza. Slouží jako zdroj uhlíku a také ovlivňuje osmotickou hodnotu média (Preřová, 1995).

Kromě sacharózy jsou důležité i další cukry, jako maltóza, cellobiosa a glukóza (Sorvari et Schieder, 1987).

Další součástí média jsou růstové regulátory. Jejich přítomnost se liší podle druhu rostliny a nemusí být nezbytná. Z dalších možných přísad se jeví jako důležité aktivní uhlí, o kterém se všeobecně předpokládá, že absorbuje inhibiční látky existující ve stopovém množství v agarovém médiu nebo toxické látky vznikající při stárnutí pletiv prašníků (Novák, 1990).

Ke ztužování média je obvykle používaná látka agar, která může do kultivačního prostředí uvolňovat etylen a jeho akumulace tak může ovlivnit průběh kultivace. Jednotlivé složky se vzájemně ovlivňují a společně se podílejí na procesech probíhajících v kultivovaných pletivech (Procházka et al., 1997).

3.2.2.9.1 Růstové regulátory

Na základě určitých analogií s působením živočišných hormonů existuje pět skupin endogenních růstových regulátorů považovaných za rostlinné hormony. Jsou to auxiny, gibbereliny, cytokininy, kyselina abscisová a etylen. Kromě nich jsou v rostlinách látky, které mají růstově regulační aktivitu, ale nejsou řazeny mezi hormony. Mezi ně patří brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmínová, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek (Procházka et al., 1997).

Auxiny

Bývají do kultivačních médií přidávány obvykle v kombinaci s cytokininy. Vzájemná kombinace podporuje dediferenciaci a opětovnou diferenciaci. Přítomnost auxinů je nezbytná pro tvorbu kalusu. Pro tvorbu kalusu téměř univerzálně působí 2,4 D (Minocha et al., 1987). Různé kombinace se využívají velmi často pro vyvolání organogeneze v orgánových a kalusových kulturách, velmi často se uplatňují i v prašníkových kulturách.

Cytokininy

Bývají do kultivačních médií přidávány obvykle v kombinaci s auxiny. Mohou však působit i samy, alespoň v některých fázích kultivace, nebo může jejich účinek silně převládat. Samy o sobě cytokininy mohou nacházet uplatnění při indukci tvorby prýtů. Při přímé regeneraci se jedná o princip potlačení apikální dominance (Wickson et Thimann, 1958).

Gibereliny

Nehrají při morfogenezi významnější roli, ale někdy mohou tento proces ovlivnit. Mohou modifikovat morfogenní efekty způsobené cytokininy a auxiny (Procházka et al., 1997),

Kyselina abscisová

Byla dlouho považována za retardant růstu. Ackerson (1984) zjistil, že v explantátové kultuře přidavek ABA podporuje normální vývin izolovaných zygotických embryí soji (*Glacine hispida*). Podobně Hess et Carman (1991) pozorovali, že zvýšený obsah ABA zlepšuje vývin izolovaných embryí pšenice (*Triticum aestivum*). Nejvýznamněji se projevuje u somatické embryogeneze.

Etylen

Biddington et Robinson (1991) pro některé druhy *Brassicaceae* učinil závěr, že etylen produkovaný pletivou prašníků androgenní odpověď inhibuje. Naproti tomu Reynolds (1989) dospěl při podrobném studiu prašníku *Solanum carolinense* k závěru, že endogenní etylen nemá vztah k tvorbě kalusu nebo k regeneraci.

Na stabilitu růstových látek může mít vliv i to, jestli se jedná tekuté nebo ztužené médium. V tekutém médiu byla průkazně stabilnější IBA ve srovnání s IAA. V médiu ztuženém byly obě látky stabilní srovnatelně (Nissen et Sutter, 1990).

3.2.2.10 Regulace androgeneze

Vznik haploidního sporofytu ze samčího gametofytu je proces regulovaný alespoň na dvou úrovních – indukce a diferenciacie pylových embryoidů. Indukční fáze zahrnuje procesy související se změnou determinace mikrospory od gametofytického ke sporofytickému vývoji. Je velmi pravděpodobné, že embryogenní mikrospory jsou ke sporofytickému vývoji determinovány již v průběhu meiozy nebo raných stádiích mikrosporogeneze. Determinace mikrospor souvisí s nepravidelnou orientací první pylové mitozy a pylovým dimorfizmem. Frekvence uvedených jevů je závislá na genetických zvláštlostech druhu a lze ji ovlivnit vnějšími zásahy. Médium a podmínky kultivace nejsou pro indukci pylové embryogeneze důležité (Novák, 1990). Produkce androgenních rostlin je genotypově závislá a souvisí s fertilitou pylu. Pyl z květů na počátku kvetení se pro androgenezi jeví jako vhodnější. Bylo také prokázáno, že pozice vyvíjejícího se pylového zrna může ovlivnit androgenní schopnost pylu (Preťová, 1995).

V indukční fázi se mění metabolismus aminokyselin a v průběhu vývoje embryoidů se snižuje hladina prolinu. Na vysoké hladině zůstávají treonin, serin, kyselina glutamová a β -aminomáselná. S metabolismem volných a vázaných aminokyselin souvisí i efekt exogenních aminokyselin přidávaných do kultivačního média. Změny metabolismu aminokyselin odpovídající začátku androgeneze *in vitro* byly indukovány chladovým ovlivněním (Sangwan et Camefort, 1984).

Na průběh diferenciaci embryoidů má vliv i vnější pylová stěna (exina). Místo prasknutí pylové stěny určuje polarizaci dospělého embryoidu, neboť v tomto místě se v dalším vývoji diferencuje vrcholový meristém stonku, zatímco na opačném konci, kde jsou zbytky exiny se diferencuje kořenový vrchol (Novák, 1990).

3.2.3 Androgeneze brambor

Indukovaná androgeneze v prašниковých a pylových kulturách byla v 80. letech využívána k produkci haploidů i u brambor. Irikura (1975) zjistil významné rozdíly ve frekvenci androgeneze v rámci 46 planých druhů bramboru (*Solanum sp.*). Kultivací prašníků 117 klonů 41 druhů *Solanum* a několika mezidruhových hybridů získal haploidy pouze u 19 druhů a 4 hybridů. Frekvence produkce monohaploidů u některých druhů brambor je uvedena v tabulce 1. Lze konstatovat, že i když byla produkce haploidů u jednotlivých genotypů různá, nikdy nebyl dosažen vysoký počet monohaploidů. Sopory et Jacobsen (1978) ukázali, že řízenou selekcí lze zvýšit frekvenci výskytu monohaploidů.

Rokka et al. (1998) získali kultivací prašníků *Solanum acaule* ssp. *acaule* Bitt. přes 250 dihaploidů.

Studie provedené na *Solanum tuberosum* ukázaly, že pylová embryogeneze mikrosfér je dědičně řízena více než jedním genem a tyto geny jsou recesivní (Smýkal, 2000).

Tabulka 1. Úspěšnost prašnickových kultur u různých 2n druhů *Solanum* a 4n *Solanum acaule* (Sopory et Bajaj, 1987)

Druh, hybrid	Počet kultivovaných prašníků	% zrege-nerovaných rostlin	% monohaploidů (ze zreg. rostl.)	Reference
<i>S. phureja</i>	100	8,00	50,00	Irikura, 1975
<i>S. stenotomum</i>	150	2,67	25,00	Irikura, 1975
<i>S. verrucosum</i>	360	33,60	68,59	Irikura, 1975
<i>S. bulbocastanum</i>	120	6,66	100,00	Irikura, 1975
<i>S. tuberosum</i>				
(H7801/10)	2452	21,08	12,90	Uhrig a Wenzel, 1981
(H7801/27)	3765	68,10	15,63	Uhrig a Wenzel, 1981
<i>S. tuberosum</i> x <i>S. chacoense</i>	18258	1,66	16,37	Cappadocia et al., 1984
Complex hybrid <i>Ip 56</i>	4351	0,09	25,00	Cappadocia et al., 1984
<i>S. chacoense</i>	2645	7,45	74,00	Cappadocia et al., 1984
<i>S. phureja</i>	1416	8,83	23,20	Veilleux, 1990
<i>Solanum acaule</i>	4011	9,22	95	Rokka et al., 1998

Výsledky práce Dunwela et Sunderlanda (1973) na různých odrůdách *Solanum tuberosum* poukázaly na sezonní vliv. Při kultivaci prašníků sbíraných v létě byla pozorována vyšší tvorba embryoidů než u prašníku sbíraných na jaře a tato skutečnost pravděpodobně souvisela s lepším zdravotním stavem letních rostlin.

Shen et Veilleux (1995) zjistili, že předpůsobením vysokou teplotou (35°C po dobu 12 hodin) na poupata bramboru, se produkce embryí ve srovnání s kontrolou zvýšila 11krát.

Chani et al. (2000) zjišťovali vliv různého stresového ošetření při kultivaci prašníků třech hybridů *Solanum phureja* Juz. & Buk. a *S. chacoense* bitt. Z jejich výsledků vyplynulo, že na variabilitu má největší vliv genotyp donorových rostlin a stádium vývoje pylu. Pěstování rostlin při teplotě 30°C a předpůsobení poupat vysokou teplotou (35°C po dobu 12 hodin) přineslo zvýšení frekvence výskytu embryí až o 40%. Na druhou stranu teplotní šok snížil rychlost regenerace rostlin a většina regenerovaných rostlin byla dihaploidních.

Vliv média na mikrosporové kultury u dvou diploidních rostlin *Solanum tuberosum* L. a jednom tetraploidu (kultivar Borka) zkoumala Říhová et Tupý (1999). Při použití média pro prašnickové kultury dle Veilleux et al. (1985) mikrospory nevykazovaly žádný další vývoj a do dvou dnů odumřely. V médiu M1 dle Tupý et al. (1991), které obsahovalo minerální složky, sacharózu, uridin, cytidin, myo-inositol, glutamin a hydrolyzát laktalbuminu, se mikrospory

dostaly do fáze prvního mitotického dělení v průběhu 14 dnů. Byla potlačena akumulace škrobu a také asymetrické dělení mikrospor, což ukazovalo na přímou inhibici vývoje pylu nezávisle na způsobu dělení mikrospor. Tento inhibiční účinek M1 média může představovat stres, který spouští indukci symetrického dělení mikrospor a následnou tvorbu mnohjaderných struktur.

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

V této práci byly použity genotypy rodu *Solanum*, které vznikly somatickou hybridizací mezi druhy *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* a *Solanum bulbocastanum* na Katedře genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze.

Pro experiment byly vybrány následující genotypy: REG 27F, REG 30F, REG 32F, REG 35F, REG 38F, REG 39F, REG 41F, REG 42F, REG 46F, REG 47F, REG 49 K, REG 50F, REG 52F, REG 56F, REG 68F, REG 70F, REG 71 F a REG 72 F.

4.2 Kultivace donorových rostlin

4.2.1 In vitro kultivace rostlin

Pro kultivaci rostlin *in vitro* byly připraveny 2 l média, jehož složky jsou:

Murashige-Skoog medium	s koncentrací 4302,09 mg/l,
Murashige-Skoog vitamíny	s koncentrací 103,1 mg/l
Sacharóza	s koncentrací 25g/l
Agar	s koncentrací 7g/l.

V roztoku připraveného z destilované vody, Murashige-Skoog média a Murashige-Skoog vitamínů byla pomocí pH metru 3310 Jenway změřena jeho hodnota pH a následně upravena na 5,7 postupným přidáváním 0,1 M KOH. Poté byla do roztoků přidána sacharóza a rozvařený agar a vše bylo důkladně rozmícháno.

Takto připravený roztok byl rozlit do skleněných kultivačních nádob o objemu 150 ml a uzavřen umělohmotným uzávěrem B-cap (Sigma) s odvětrávacím otvorem a molitanovou zátkou. Každá nádoba obsahovala 25 ml média. Sterilizace sklenic s médiem proběhla v autoklávu Valueclave (Tuttnauer) při 121 °C a tlaku 101,5 kPa po dobu 20 minut.

Pasážování rostlin bylo provedeno v aseptickém prostředí flowboxu Gelaire TC48 Flaw laboratories. Pomůcky a prostor boxu byl povrchově sterilizován 70% etanolem.

Do jedné nádoby byly umístěny 3-4 jednodílné řízkové výhonky jednoho genotypu. Pro každý genotyp byly připraveny 2 nádoby s popisem vzorku a datem založení. Poté byl okraj uzávěru zabezpečen parafínovou fólií (Parafilm), sloužící k ochraně proti vysoušení a kontaminaci a pro snazší manipulaci. Nádoby s řízkem byly umístěny do kultivačního boxu Sanyo MLR – 351H.

Kultivace rostlin probíhala při fotoperiodě 16 hodin den/8 hodin noc, teplotě 24 °C ve dne a 18 °C v noci a 50% relativní vzdušné vlhkosti. Hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů (PPF) byla nastavena na 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, přičemž intenzita osvětlení byla 14500 lx.

4.2.2 Ex vitro kultivace rostlin

Po necelých 4 týdnech kultivace *in vitro* (8. 4. 2015) byly rostliny přesazeny do perlitu. V následujících 9 dnech byly otužovány v laboratoři při běžné provozní teplotě s vysokou vzdušnou vlhkostí a poté vysazeny do výsevního substrátu a přeneseny do skleníku. Do zahradnického substrátu byly rostliny přesazeny tři týdny ode dne, kdy byly přesazeny do perlitu. V polovině května byly vzrostlé rostliny vysazeny na pokusný pozemek ČZU v Praze 6.

4.3 Příprava a kultivace rostlinného materiálu pro androgenezi

4.3.1 Stanovení vývojové fáze mikrospor / Výběr poupat

Vhodná vývojová fáze mikrospor byla stanovena následovně:

- z mateřské rostliny bylo odebráno celé květenství, obsahující 7 poupat různých velikostí
- jednotlivá poupata byla očíslována čísly 1-7 a změřena jejich délka. Nejmenší měřila do 2 mm a největší dosahovala až 6 mm (obrázek 2)
- prašníky z jednotlivých poupat byly přeneseny na samostatná podložní sklíčka (obrázek 3). Z prašníků každého poupěte byl připraven samostatný preparát (obrázek 4)
- stádium mikrosporogeneze pylových zrn bylo u jednotlivých preparátů pozorováno pod světelným mikroskopem typu Olympus BX 50 při zvětšení 400× až 600×
- jako nejvhodnější se jevila poupata o velikosti 2-3 mm.

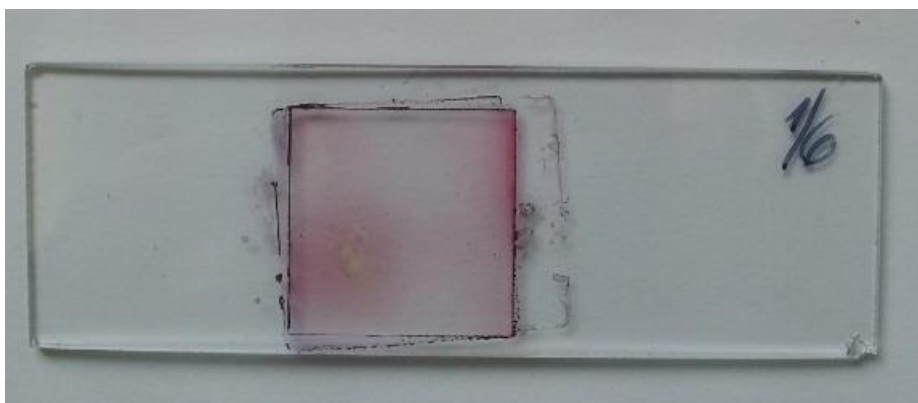
Obrázek 2



Obrázek 3



Obrázek 4



4.3.2 Příprava médií pro kultivaci prašníků

Pro kultivaci prašníků bylo připraveno 12 variant kultivačních médií, lišících se složením a koncentrací základního media a přidanými růstovými regulátory (RR).

Pro přípravu médií A - D bylo jako základní kultivační médium použito Murashige-Skoog médium (MS) ve složení:

Murashige-Skoog médium s koncentrací 4 302,09 mg/l,

Murashige-Skoog a vitamíny s koncentrací 103,1 mg/l,

sacharóza v koncentraci 6g/l,

agar s koncentrací 5 g/l a

aktivní uhlí s koncentrací 5 g/l.

Složení médií I – L bylo stejné s výjimkou sacharózy, která byla v koncentraci 60g/l.

Pro přípravu E – H bylo jako základní kultivační médium použito Schenk - Hildebrandt (SH) médium ve složení

Schenk - Hildebrandt médium s koncentrací 2 384,44 mg/l,

Schenk - Hildebrandt vitamíny s koncentrací 757,875 mg/l,

sacharóza v koncentraci 60g/l,

agar s koncentrací 5 g/l a

aktivní uhlí s koncentrací 5 g/l.

Pro úpravu pH na hodnotu 5,7 byl použit 0,1M roztok KOH.

Média byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C a přetlaku 100 kPa po dobu 20 minut. Přidání RR do médií a rozlití do Petriho misek probíhalo asepticky ve flowboxu.

Označení a koncentrace základního média		Přidané růstové regulátory
A	MS 100%	BAP s koncentrací 45,4 µg/l
B	MS 50%	BAP s koncentrací 45,4 µg/100 ml
C	MS 100%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml
D	MS 50%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml
E	SH 100%	BAP s koncentrací 45,4 µg/l
F	SH 50%	BAP s koncentrací 45,4 µg/100 ml
G	SH 100%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml
H	SH 50%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml
I	MS 100%	BAP s koncentrací 45,4 µg/l
J	MS 50%	BAP s koncentrací 45,4 µg/100 ml
K	MS 100%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml
L	MH 50%	2,4 D s koncentrací 0,1mg/100 ml kinetin s koncentrací 50 µg/100 ml

4.3.3 Odběr rostlinného materiálu

Pro kultivaci prašníků byla sbírána neotevřená poupata z mateřských rostlin průběžně od 11. do 22. září roku 2015. Z každého genotypu bylo odebráno přibližně 20 pupat a vloženo do označených 2 ml polypropylenových zkumavek. Označení bylo následovné.

Označení	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Genotyp	27F	30F	32F	38F	39F	41F	42F	46F	47F	49F	50F	56F	68F	70F	72F

4.3.4 Předpůsobení a sterilizace pupat

Před izolací a kultivací prašníků byla poupata vystavena chladovému předpůsobení, tzn., že poupata byla na 12 hodin uložena do chladicího boxu s teplotou 4°C a poté byla sterilizována dvěma způsoby. První způsob povrchového ošetření pupat byl proveden ve dvou krocích

- Do zkumavek s neporušenými pupaty byl přidán 70% ethanol a ponechán k působení po dobu 5 minut
- Po uplynutí této doby byl ethanol odstraněn a desinfekce pokračovala máčením pupat v 12 % roztoku Sava po dobu 20 minut.

Druhý způsob povrchové sterilizace pupat sestával pouze z máčení pupat v 70% ethanolu po dobu 5 minut.

Poté, již v aseptickém prostředí flowboxu, byla poupata opláchnuta 3x sterilní destilovanou vodou a uložena do uzavřených sterilních Petriho misek (55 mm), aby se zabránilo jejich vysychání.

4.3.5 Izolace prašníků

Z pupat byly postupně pomocí preparační jehly vylamovány prašníky a umístovány do označených Petriho misek na kultivační médium. Na každou misku o průměru 55 mm obsahujících přibližně 5 ml kultivačního média bylo položeno 8-10 prašníků ze dvou pupat jednoho genotypu. Každá miska byla popsána datem založení pokusu, označením použitého média a genotypu rostliny. Nakonec byly misky zabezpečeny parafínovou fólií.

Celkově bylo připraveno 408 misek. V 360 miskách byly prašníky, jejichž poupata byla sterilizována kombinací ethanolu a Sava. Ve zbylých 48 miskách byly prašníky z pupat ošetřených pouze ethanolem. Tento způsob sterilizace pupat by měl být šetrnější. I když vzhledem k pozdějšímu odběru se podařilo pokus založit jen u vybraných hybridů, byl použit

na porovnání účinnosti různých způsobu sterilizace poupat. Detailní informace o počtu založených misek, použité sterilizaci a datu založení pokusu, jsou v tabulce 2 Fotografie založených misek je na obrázku 4.

Tabulka 2 Počet misek pro jednotlivé genotypy, média a způsoby sterilizace poupat

Datum	Médium	Způsob sterilizace	27F	30F	32F	38F	39F	41F	42F	46F	47F	49F	50F	56F	68F	70F	72F	
11.9.	A	Ethanol + Savo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
11.9.	B		2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
11.9.	C		2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11.9.	D		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15.9.	E		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15.9.	F		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15.9.	G		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15.9.	H		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17./18. 9.	I		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17./18. 9.	J		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17./18. 9.	K		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17./18. 9.	L		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
22.9.	E	Ethanol	1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	F		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	G		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	H		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	I		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	J		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	K		1				2			2	2	1	1		2	1		
22.9.	L		1				2			2	2	1	1		2	1		

Obrázek 4. Misky s izolovanými prašníky ihned po založení pokusu



4.3.6 Kultivace prašníků

Během měsíce září 2015 bylo celkem izolováno 4 235 prašníků z poupat 15 genotypů somatických hybridů. Ke kultivaci bylo použito 12 variant kultivačních médií a kultivace probíhala ve dvou různých prostředích. První týden byly všechny misky kultivovány ve tmě při teplotě 25°C. Po týdnu část z nich (misky, u kterých je v tabulce 2 uvedeno číslo 2) byla umístěna do kultivačního boxu Sanyo MLR – 351H. Zde probíhala kultivace při fotoperiodě 16 hodin den /8 hodin noc, teplotě 24°C ve dne a 18°C v noci a 50% relativní vzdušné vlhkosti. Zbylé misky zůstaly v původním prostředí. Průběžně byly u všech misek kontrolovány kontaminace, nekrotizace prašníků, tvorba a vzhled regenerovaných kalusů.

4.3.7 Příprava regeneračního média pro indukci organogeneze

Organogeneze je proces, při kterém vznikají jednotlivé rostlinné orgány a složení kultivačních médií má na její průběh přímý vliv. Pro indukci organogeneze kalusů bylo použito médium, jehož základ tvoří Murashige et Skoog (1962) a do kterého byly přidány rostlinné hormony IAA v koncentraci 0,001 μ g / 100 ml, GA3 v koncentraci 0,05 μ g / 100 ml a Zeatin v koncentraci 0,3 mg / 100 ml (Sedláková, 2010).

5 Výsledky

Dosažené výsledky této práce jsou úzce provázány s metodikou, která byla navržena na základě dosažitelných literárních pramenů a přizpůsobena podmínkám laboratoře.

5.1 Stanovení vývojového stádia pylových zrn

Pro kultivaci se jako nejvhodnější jeví prašníky obsahující pylová zrna v jednojaderném vývojovém stádiu. Po barvení prašníků z poupat různých velikostí acetokarmínem bylo stanoveno, že optimální velikost uzavřených poupat je 2-3 mm.

5.2 Předpůsobení a sterilizace poupat

Vzhledem k tomu, že prašníky byly uzavřeny v nerozvitém a neporušeném poupěti, nedocházelo u nich ke kontaktu s okolím. Po 17 dnech od založení posledního pokusu bylo provedeno vyhodnocení kontaminací, z pohledu kontaminace bodové, kdy byl kontaminován pouze některý z prašníků a kontaminace se nerozšířila dále, a celkové, kdy byla kontaminací zasažena větší část misky. Vzhledem k tomu, že počty misek s jednotlivými způsoby sterilizace byly rozdílné, pro vyhodnocení bylo použito procentuální vyhodnocení kontaminací. Výsledky v tabulce 3. ukazují, že při ošetření poupat pouze ethanolem celkově dochází k téměř dvojnásobné kontaminaci. Testování shodnosti zásahů chí-kvadrát testem ukazuje, že rozdíly jsou statisticky významné ($p = 0,0001$).

Tabulka 3. Srovnání různých způsobů sterilizace poupat

Typ kontaminace	Typ sterilizace	
	Ethanol a Savo	Pouze Ethanol*
Celková	3,5%	10,4%
Bodová	9,3%	12,5%
Celkem	12,8%	22,9%

5.3 Kultivace prašníků

V miskách založených 11. 9. 2015, ve kterých byly prašníky kultivované ve tmě a při teplotě 25°C, byly 18 dní po založení pokusu rozpoznatelné první kalusy a to u genotypů Reg 42F a Reg 68F.

V průběhu kultivace bylo několikrát provedeno pasážování. Při prvním pasážování, které proběhlo 21. 10. 2015, byly prašníky / kalusy z médií A – D převedeny na médium I – L. Důvodem pro toto bylo sjednocení koncentrace sacharózy u všech dále používaných médií a také skutečnost, že koncentrace sacharózy významně neovlivnila tvorbu kalusů na jednotlivých médiích. Testování rozdílů pomocí chí kvadrát testu neprokázalo vliv různé koncentrace sacharózy ($p = 0,9818$). Procenta prašníků s odezvou ve formě tvorby kalusů jsou uvedena v tabulce 5. Pro další kultivace již byla používána pouze média E – G a I – L.

Tabulka 5 Počet kalusů získaných z celkového počtu nasazených prašníků na daném médiu

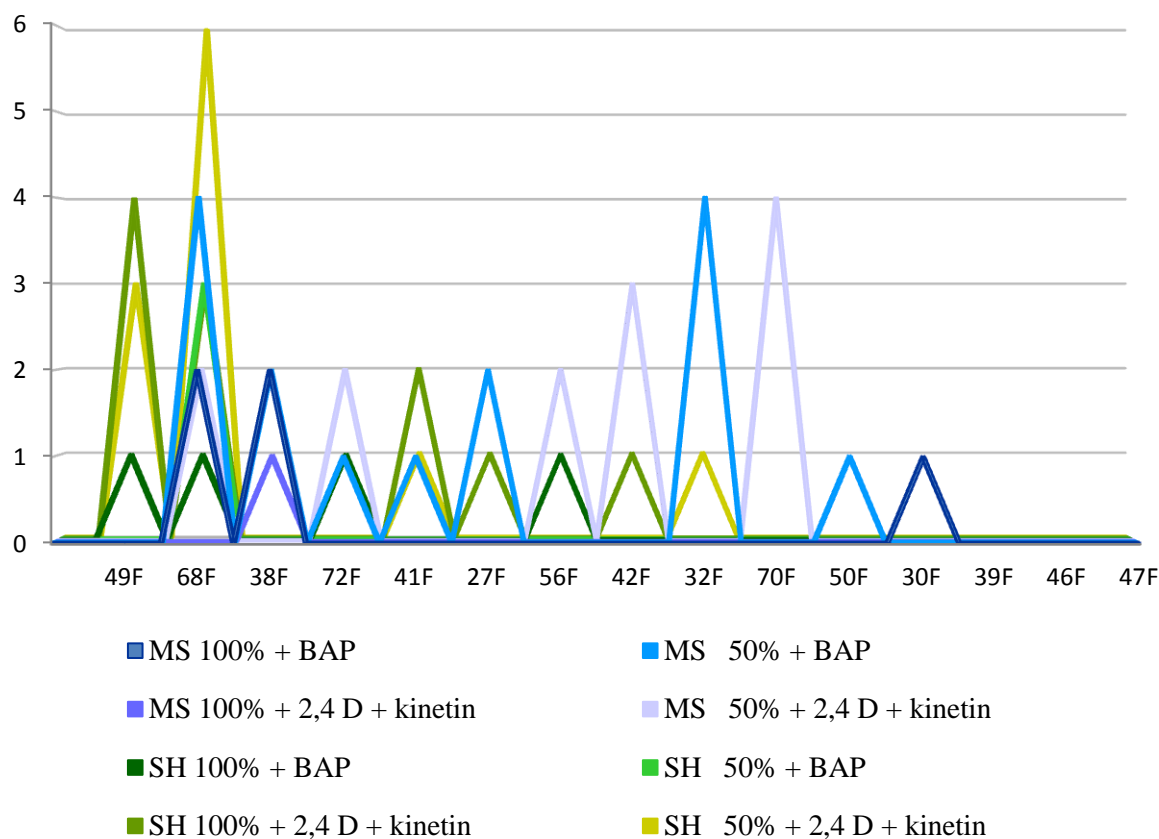
	0,6% sacharóza		6% sacharóza	
	MS 100% + BAP	A	4,8%	I
MS 50% + BAP	B	4,1%	J	4,8%
MS 100% + 2,4 D + kinetin	C	4,4%	K	4,1%
MS 50% + 2,4 D + kinetin	D	3,3%	L	3,3%

Z celkového počtu 4 235 izolovaných prašníků bylo po čtyřech měsících kultivace získáno 63 kalusů, jejichž velikost se pohybovala mezi 1-3 mm. Kalusy měly bělavou až nažloutlou barvu a byly kompaktní.

Celý pokus byl ovlivněn řadou faktorů, genotypem a fyziologickým stavem rostliny, časem sběru poupat, stádiem vývoje pylu při inokulaci, stresovým předpůsobením, kultivačními podmínkami, a každý z nich mohl být zatížen určitou chybou. Dosažené výsledky proto jen naznačují určité trendy a hypotézy, které by bylo vhodné v budoucnu ověřit. Detailní graf četností získaných kalusu z pohledu jednotlivých genotypů dokumentuje graf 1 a tabulka 6.

Na proces indukované androgenese měl zřejmě největší vliv genotyp testovaných hybridů. Zjistili jsme, že odezva prašníků hybridu REG 68F byla silná (na téměř všech médiích), a získali jsme 21 kalusů z 200 kultivovaných prašníků. Na druhou stranu u genotypů REG 39F, REG 46F a REG 47F se nepodařilo indukovat ani jeden kalus. Silnější odezvu prokázaly také prašníky genotypu REG 49F a to pouze na médiu SH (8 kalusů). Po 4 kalusech bylo získáno z genotypů REG 32F, REG 70F a REG 42F.

Graf 1 Počet kalusů v rozpadu dle genotypu a použitého média



Tabulka 6 Počet získaných kalusů pro jednotlivé genotypy

Médium	27F	30F	32F	38F	39F	41F	42F	46F	47F	49F	50F	56F	68F	70F	72F	Celkem
MS 100% + BAP		1		2									2			5
MS 50% + BAP	2		4	2		1					1		4		1	15
MS 100% + 2,4 D + kinetin				1												1
MS 50% + 2,4 D + kinetin							3					2	2	4	2	13
Celkem MS	2	1	4	5		1	3				1	2	8	4	3	34
Celkem MS ve tmě	1			3		1	1				1	2	3	1	1	14
Celkem MS v boxu	1	1	4	2			2						5	3	2	20
SH 100% + BAP										1		1	1		1	4
SH 50% + BAP													3			3
SH 100% + 2,4 D + kinetin	1					2	1			4			3			11
SH 50% + 2,4 D + kinetin			1			1				3			6			11
Celkem SH	1		1			3	1			8		1	13		1	29
Celkem SH ve tmě	1					1	1			2		1	6			12
Celkem SH v boxu			1			2				6			7		1	17
Celkem	3	1	5	5		4	4			8	1	3	21	4	4	63

Pro vyhodnocení vlivů médií, růstových regulátorů (RR) a způsobu kultivace prašníků na indukci kalusů a za hypotetického předpokladu nulového vlivu genotypu jsme získaná data znormovali. To znamená, že jsme bez ohledu na to, kolik kalusů se z daného genotypu podařilo získat, každé misce, obsahující alespoň jeden kalus přiřadili stejnou váhu rovnou 1. Vliv médií, RR a způsob kultivace prašníku je tedy dále hodnocen nejen z pohledu absolutních čísel (počtu získaných prašníků), ale i z pohledu eliminace vlivu genotypu.

Vliv médií bez ohledu na vliv genotypu (tabulka 7) na tvorbu kalusů byl statisticky prokázán, testování shody četnosti kalusů mezi kombinacemi médií chí-kvadrát testem prokázalo významné rozdíly. Byl prokázán vliv použitých základních médií ($p \ll 0.0001$) i jejich kombinací s růstovými regulátory ($p = 0,0001$). V případě použití SH média byly rozdíly ve volených koncentracích méně markantní, přesto byl zaznamenán rozdíl ($p = 0,043$). V absolutním počtu kalusů jsme při použití média MS získali 34 kalusů, při použití SH média 29 kalusů. Po vyloučení vlivu genotypu lze konstatovat téměř stejnou odezvu média na indukci kalusů. Podařilo se získat 20 misek s MS médiem a alespoň jedním kalusem a 19 misek s SH médiem.

V prostředí kultivačního boxu Sanyo MLR – 351H (s fotoperiodou) se podařilo v absolutních číslech indukovat 37 kalusů, zatímco v prostředí bez fotoperiody pouze 26. Počet genotypů, na kterých se podařilo odvodit alespoň jeden kalus, byl v kultivačního boxu i v prostředí bez fotoperiody téměř stejný. Četnosti kalusů podle způsobu kultivace byly na základě tabulky 7 porovnány chí kvadrát testem, vliv kultivace nebyl prokázán ($p = 0,93$).

Nejvyšší výtěžky kalusů poskytovaly tyto kombinace médií, plné či poloviční MS médium s BAP (12 genotypů a 20 kalusů) a SH médium s 2,4D a kinetinem (13 genotypů a 22 kalusů). Při započtení vlivu genotypů vychází lépe zmíněná kombinace MS média, jelikož pouze REG 49F reagoval velmi pozitivně na SH médium. Zda to byl jev náhodný či nikoliv je třeba dále ověřit.

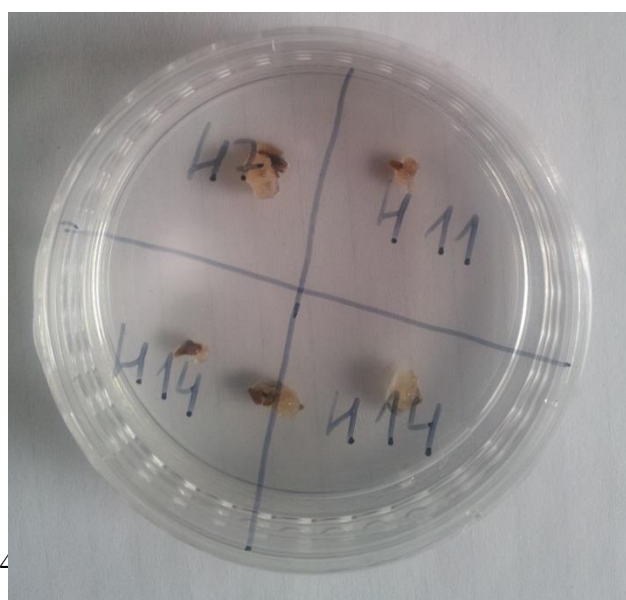
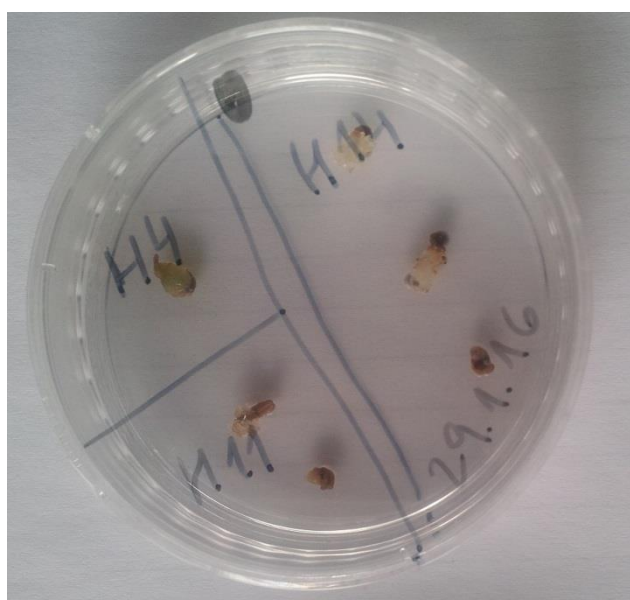
Tabulka 7 Vliv způsobu kultivace a použitého média na indukci kalusů za hypotetického předpokladu nulového vlivu genotypu

Typ média	Způsob kultivace		Celkem
	bez fotoperiody	s fotoperiodou	
MS 100% + BAP	2	1	
MS 50% + BAP	5	4	
Celkem MS + BAP	7	5	12
MS 100% + 2,4 D + kinetin	1	0	
MS 50% + 2,4 D + kinetin	3	4	
Celkem MS + 2,4 D + kinetin	4	4	8
Celkem MS	11	9	20
SH 100% + BAP	1	3	
SH 50% + BAP	1	1	
Celkem SH + BAP	2	4	6
SH 100% + 2,4 D + kinetin	4	3	
SH 50% + 2,4 D + kinetin	3	3	
Celkem SH + 2,4 D + kinetin	7	6	13
Celkem SH	9	10	19

5.4 Regenerace kalusů

Vypěstované kalusy byly 29. 1. 2016 přepasážovány na regenerační medium a uloženy do kultivačního boxu. K regeneraci prýtlů prozatím nedošlo.

Obrázek 5 Kalusy získané kultivací prašníků a určené k indukci organogeneze



6 Diskuze

Indukovaná androgeneze v prašниковých, pylových a mikrosporových kulturách patří k nejčastěji používaným biotechnologickým metodám vhodných pro produkci haploidů. (Germana, 2010). Pro založení pokusu s cílem prakticky si odzkoušet proces androgeneze v umělých podmínkách bylo použito 15 genotypů rodu *Solanum*, které vznikly somatickou hybridizací mezi druhy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a *Solanum bulbocastanum*.

Produkce kalusů byla u různých genotypů různá. Nejvíce kalusů se podařilo vytvořit u genotypu REG 68F. Osm kalusů bylo na MS médiu a 13 na SH médiu. U genotypu REG 49F se indukovalo 8 kalusů, ale pouze na SH médiu. U třech genotypů, REG 39F, REG 46F a REG 47F byla produkce kalusů na všech médiích neúspěšná. Tyto výsledky naznačují možné vlivy genotypu, fyziologického stavu dárcovské rostliny, fertility pylu či období sběru prašníků na tvorbu kalusů. V případě genotypů REG 68F a REG 39F, REG 46F, REG 47F bychom mohli souhlasit s teorií Nováka (1990) o tom, že determinace mikrospor je závislá na genetických zvláštnostech druhu, přičemž médium a podmínky kultivace nejsou pro indukci androgeneze důležité. Indukce kalusů u genotypu REG 49F pouze na SH médiu ale ukazuje i jistou interakci genotypu a kultivačního média či dalších faktorů.

Vliv povrchové sterilizace poupat a předpůsobení.

Nasbíraná poupata ještě před preparací prašniku byla povrchově povrchově ošetřena. Sterilizaci jsme se rozhodli provést dvěma způsoby. První způsob kombinoval máčení poupat v 70% ethanolu po dobu 5 minut a Sava po dobu 20 minut. Tento způsob je pro sterilizaci využíván běžně (Maluszynski *et al.* (2003). Druhý způsob spočíval v sterilizaci poupat 70% ethanolem po dobu 5 minut. Proplachování sterilní vodou bylo v obou případech stejné. Kontaminace po tomto ošetření se téměř zdvojnásobila.

V našem experimentu bylo použito chladové předpůsobení 4°C po dobu cca 20 hodin. Teplotní šok je nejznámější a bývá považován za nejúčinnější (Zur *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že různé druhy rostlin mají různé nároky na rozsah teploty i dobu působení, bývají podmínky předpůsobení obvykle stanovovány experimentálně (Bajaj *et al.* 1977).

Shen *et Veilleux* (1995) a Chani *et al.* (2000) zjistili, že předpůsobením vysokou teplotou na poupata bramboru, se zvyšuje frekvence výskytu embryí, ale snižuje se rychlost regenerace rostlin a většina regenerovaných rostlin byla dihaploidních.

Vliv vývojového stádia pylových zrn

V našem experimentu bylo zjištěno, že optimální velikost uzavřených pupat je 2-3 mm. Vyšli jsme z poznatku, že délka květních pupat přímo koreluje s vývojovým stádiem pylu (Preťová, 1995). Octokarmínovou metodou (Sharma a Sharma, 1972) jsme zjistili, že v pupatech této velikosti byly prašníky ve vývojovém stádiu jednojaderných mikrospor, které je pro indukovanou androgenezi vhodné (Nitch et Nitch, 1969).

Vliv média

Pro náš experiment jsme použili MS a SH média s přídavkem agarů, sacharózy, aktivního uhlí a dvou kombinací růstových hormonů. Rozhodnutí o použití právě těchto médií vycházelo z doporučení Preťové (1995) a také z jejich dostupnosti. Obohacení základního média o aktivní uhlí vycházelo z doporučení Sopory et Bajaj (1987). Předpokládá se o něm, že absorbuje inhibiční látky existující ve stopovém množství v agarovém médiu nebo toxické látky vznikající při stárnutí pletiv prašníků (Novák, 1990).

Pro indukci androgeneze je klíčovým faktorem sacharóza, která slouží jako zdroj uhlíku a také ovlivňuje osmotickou hodnotu. Sopory et Bajaj (1987) publikovali, že k odezvě prašníků dochází na médiích s koncentrací sacharózy vyšší než 4%. Zkušenosti z našeho experimentu nepotvrdily nezbytnost 4% koncentrace sacharózy u MS média. Odezva prašníků byla téměř stejná při použití sacharózy v 6% i 0,6% koncentraci.

V obou médiích došlo k odezvě prašníků. Ve světle statistického hodnocení dat (viz. tabulka 7) se pro indukci kalusů jeví vhodnější MS médium než HS médium. Pro MS médium výrazně lepších výsledků bylo dosaženo s růstovými regulátory BAP, přičemž 50% MS se jeví jako nejvhodnější. Na tomto médiu indukce proběhla u 9 genotypů (na 9 miskách) a celkem bylo získáno 15 kalusů. Pro SH médium lepších výsledků bylo dosaženo s 2,4D a kinetinem a to v obou koncentracích.

Vliv média M1 (Tupý et al., 1991) na mikrosporové kultury u dvou diploidních rostlin *Solanum tuberosum* L. a jednom tetraploidu (kultivar Borka) zkoumala Říhová a Tupý (1999). V tomto médiu obohaceném o minerální složky, sacharózu, uridin, cytidin, myo-inositol, glutamin a hydrolyzát laktalbuminu, se mikrospory dostaly do fáze prvního mitotického dělení v průběhu 14 dnů.

Z celkového počtu 4 235 izolovaných prašníků bylo získáno 63 kalusů o velikosti 1-3 mm. Výsledky našeho experiment ukázaly, že dle navrženou metodikou lze indukovat tvorbu kalusů. Největší potenciál ukazují genotypy REG 68F a REG 49F. Rozdílná odezva prašníků při

kultivaci různých kultivarů brambor je dokumentována i v práci Asakaviciute (2008). Největší dosažená response byla 17.4%. V našem experimenty jsme dosáhli nejvyšší indukce kalusů u genotypů REG 68F, a to 13% a REG 49F 5%.

7 Závěr

Převedení *in vitro* pěstovaných hybridů rodu *Solanum*, REG 27F, REG 30F, REG 32F, REG 35F, REG 38F, REG 39F, REG 41F, REG 42F, REG 46F, REG 47F, REG 49K, REG 50F, REG 52F, REG 56F, REG 68F, REG 70F, REG 71F a REG 72F do podmínek *ex vitro* a následné vypěstování dárcovských rostlin vhodných pro odběr prašníků bylo úspěšné na 83%. U klonů REG 35F, REG 52F, REG 71F se nepodařilo vypěstovat rostliny vhodné pro odběr prašníků.

Na základě literární rešerše byla pro indukovanou androgenezi u brambor navržena metodika, která byla v praktické části této práce experimentálně ověřena, a byly dosaženy tyto výsledky.

- i. Z celkového počtu 4 235 izolovaných prašníků bylo po čtyřech měsících kultivace získáno 63 kalusů, jejichž velikost se pohybovala mezi 1-3 mm.
- ii. Jako nevhodnější se pro prašníkovou kulturu jevila poupata o velikosti 2-3 mm, protože obsahovala prašníky s mikrosporami v jednojaderném stádiu.
- iii. Z pohledu zabránění kontaminací při kultivaci prašníků je sterilizace květních pupenů kombinací ethanolu a Sava téměř 2x účinnější než sterilizace pouhým ethanolem
- iv. Koncentrace sacharózy v MS médiu neměla vliv na indukci kalusů
- v. Schopnost indukce kalusů u testovaných genotypů byla odlišná. Nejlepší výsledky byly dosaženy u genotypu REG 68F a to na téměř všech typech médií.
- vi. Vliv média na indukci kalusů byl statisticky prokázán, univerzálnější (vhodnější pro více genotypů) se jevílo MS médium
- vii. Jako nejlepší médium pro indukci androgeneze u jednotlivých genotypů se ukázalo MS s poloviční koncentrací živin a růstovým regulátorem BAP. Indukce kalusů proběhla u 9 genotypů a celkem bylo indukováno 15 kalusů.
- viii. Různé kultivační podmínky výrazněji neovlivnily tvorbu kalusů.
- ix. Kalusy byly převedeny na regenerační médium, ale k organogenezi zatím nedošlo.

V závislosti na dosažených výsledcích lze konstatovat, že navržena metodika je vhodná minimálně pro odvození kalusů.

8 Přehled citované literatury

Ackerson, R. C.. 1984. J. Exp. Bot. 35: 403 - 413.

Asakaviciute, R., 2008. Androgenesis in Anther Culture of Lithuanian Spring Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. Turk J Biol. 32: 155-160.

Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., Djilianov, D. 1995. In vitro production of haploid plants. World J Microbiol Biotechnol 11:400–408.

Bajaj, Y. P. S. 1987. Biotechnology in Agriculture and Forestry 3, Potato. Springer-Verlag, 187 – 194. ISBN 3-540-17966-6.

Bradshaw, J. E., Mackay, G. R. 1994. Potato genetics. CAB International, Cambridge, 552 p. ISBN 0-85198-869-5.

Biddington, N. L., Robinson, H. T. 1991. Plant Cell Tissue Org. Cult. 25: 169-177.

Binarova, P. Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H.G., van Lookeren Campagne, M. M. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex Plant Reprod 10:200–208.

Campbell, N., A., Reece, J., B. 2006. Biologie. Computer Press, a. s.. ISBN 80-251-1178-4.

Chani, E., Veilleux, R. E., Boluarte-Medina, T. 2000. Improved androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 101–112.

Datta, S. K. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science, Vol. 89, 1870-1878.

Dunwell, J.M. 1976. a comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana Tabacum*. Environmental and Experimental Botany. Volume 16. Issues 2–3. 109–118 p.

Dunwell, J. M. and Sunderland, N. 1973. Anther culture of *Solanum Tuberosum* L . Euphytica 22: 317-323.

- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha K. J., Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* Vol.12 No.8.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Experimental Cell Research*, vol. 50, pp. 151–158.
- Germana, M. A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:283–300.
- Guha, S., Maheshwari, S. C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, Vol. 204, No. 4957, pp. 497, ISSN 0028-0836.
- Hack, H., Gall, H., Klemke, Th., Klose, R., Meier, U., Stauss, R., Witzemberg, A. 1993. Phanologische Entwicklungsstadien der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 45. S.11-19.
- Halterman, D. , Guenther, J., Collinge, S., Butler, N., Douches, D. 2016. Biotech Potatoes in the 21st Century: 20 Years Since the First Biotech Potato. *Am. J. Potato Res* 93:1–20.
- Hawkes, J. G. 1990. *The Potato Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press. London. ISBN 1-85293-045-4.
- Hess, J. R., Carman, J. G. 1991. *Plant Physiol.* 96: 76.
- Hougas, R. W., Peloquin, S. J. 1960. *Eur. Potato J.* 3: 325.
- Hruška, L. et al. 1974. *Brambory*. Praha. SZN. 416s.
- Huxter, T. J., Reid, D. M., Thorpe, T. A. 1979. Ethylene Production by Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Callus. *Physiol, Plant*, 46: 374-380. 1979.
- Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to anther cultures of cereal crops. In: *Proceedings of symposium on Plant Tissue Culture Science Press. Peking.* S.43-50.
- Irikura, Y. 1975. Induction of haploid plants nz anther culture in tuber bearing species and interspecific hzbrids of *Solanum*. *Potato Res* 18: 133-140.
- Islam, S.M.S, Tuteja, N. 2012. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science* 182: 134– 144p.

Kutnar, F. 2005. Malé dějiny brambor. 2. vydání. Pelhřimov: Nová tiskárna Pelhřimov. 216 s. ISBN 8086559300.

Maluszynski et al. Doubled haploid production in crop plants: a manual, edited by (2003a, b).

Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, H. P., Wang, M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 417, pp. 1711–1726.

McCormick, S. 1993: Male Gametophyte Development. *The Plant Cell* (1993), Vol. 5, 1265-1275.

Mendiburu, A. O., Peloquin, S. J., Mok, D. W. S. 1974. In Kasha, K. J. (ed.): *Haploids in Higher Plants*. P. 249. Univ. Guelph

Minocha, S. . 1987. In: Bonga, J. M., Durzan, D.J. (eds): *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 50-66.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. a revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15. p. 473 – 497.

Nissen, S., J., Sutter, E., G. 1990. Stability of IAA and IBA in Nutrient Medium to Several Tissue Culture Procedures, *HortScience* 25(7): 800-802.

Nitch, J. P., Nitch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163. S. 85-87.

Novák, J., Skalický, M. 2012. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788087415535.

Novák, F. J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia. Praha. 208 s. ISBN: 8020003444.

Novák, F. J., Vyskot, B. 1974. In: Erdelský, K. *Kolovium o rostlinných explantátových kulturách*. Stupy při Pezinku, p.109. Univerzita Komenského. Bratislava.

Preťová, A. 1995. Embtyogenéza vyšších rastlín v in vitro podmienkach VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. Bratislava. ISBN 80-224-0419-5. 228: 107–114.

- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. et al. 1998. Fyziologie rostlin. Academia. Praha. 460 s. ISBN: 8020005862.
- Procházka, S., Šebánek, J. et al. 1997. Regulátory rostlinného růstu. Academia. Praha. 395 s. ISBN: 8020005978.
- Ramanna, M. S. 1974. Euphatica 23: 623.
- Rashid, A. and Street, H. E. 1973. The Development of Haploid Embryoids from Anther Cultures of *Atropa belladonna* L. Planta (Berl.) 113, 263—270. 9 by Springer-Verlag.
- Reynolds, T. L. 1989. Plant Sci. 61:131-136.
- Rod, J. 1982. Šlechtění rostlin. 1. vyd. Praha: SZN. 1982. - 354 s.
- Rokka, V. M., Ishimaru, C. A., Lapitan E. Pehu, N. L. V. 1998. Production of androgenic dihaploid lines of the disomic tetraploid potato species *Solanum acaule* ssp. *acaule*. Plant Cell Reports 18: 89–93. Springer-Verlag.
- Rybáček, V. et al. 1988, Brambory, Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1988, 360 s.
- Říhová, L., Tupý, J. 1999. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 135–145.
- Sangwan, R. S., Camefort, H. 1984. Cold-treatment related structural modifications in the embryogenic anthers of *Datura*. Cytologia 49, s.473-487.
- Sedláková, V. 2010. Tvorba a molekulární detekce somatických hybridů bramboru s vyšší odolností k plísni bramboru (Disertační práce), Praha, s.158, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra genetiky a šlechtění.
- Seguí-Simarro, J. M. 2010. Androgenesis Revisited. Bot. Rev. 76: 377–404p.
- Sharma, A. K., Sharma, A. 1972. Chromosome techniques. Butterworths/ University Park Press, London/Baltimore.
- Shen, L. Y., Veilleux, R. E. 1995. Yield of embryos from sequential anther culture. American Potato Journal, Volume 72. Issue 11. pp 689-700.

- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. 50 (1). p. 199 – 204.
- Skoog, F., Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia Society for Experimental Biology*, 54 (11), p. 118 – 130.
- Smýkal, P. 2000. Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum* (2000) 43 (4): 481- 489.
- Sopory S., Munshi, M. 1996. Anther culture. In: Mohan JM et al (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 1. Kluwer, Dordrecht, pp 145–176.
- Sopory, S., K., Bajaj, Y., P., S. 1987. Anther Culture and Haploid Production in Potato. In: Bajaj, Y. P. S. 1987. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 3. Potato*, Springer – Verlag, 195 – 210. ISBN 3-540-17966-6.
- Sopory, S. K., Jacobsen, E.; Wenzel, G. 1978. Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum-tuberosum*. *Plant science letters*. Volume: 12. Issue: 1. 47-54p.
- Sorvari, S., Schieder, O. 1987 Influence of Sucrose and Melibiose on Barley Anther Cultures in Starch Media. *Plant Breeding* Volume 99. Issue 2. 164–171p.
- Spooner, D. M., Ghislain, M., Simon, R., Jansky, S. H., Gavrilenko, T. 2014. Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *Bot. Rev.* 80:283–383
- Sunderland, N., Huang, B. 1987. *Int. Rev. Cytol.* s. 107-219.
- Sunderland, N., Wilson, D. 1979. A note on the pretreatment of excised flower buds in float culture of *Hyoscyamus* anthers. *Plant Science Letters* 15, 169-175.
- Telmer, C. A., Newcom, W., Simmonds, D. H. 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 84:417–424.

Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1996. Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep* 15:561–565.

Tupý, J., Řihová, L., Žárský, V. 1991. Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension culture and its storage for in situ pollination. *Sexual Plant Reproduction*. Volume 4. Issue 4. pp 284-287.

Veilleux, R. E., Boozedaniels, J., Pehu, E. 1985. Anther culture of a 2n pollen producing clone of *Solanum-Phureja* Juz and Buk. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. Volume: 27. Issue: 5. Pages: 559-564.

Vokál, B. et al., 2004. Pěstování brambor. Agrospoj. Praha. 261 s.

Vokál, B. et al., 2013. Brambory: šlechtění, pěstování, užití a ekonomika. Profi Press, s.r.o. Praha. 160 s. ISBN: 9788086726540.

Wang, M., van Bergen, S., Van Duijn, B. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol* 124:523–530.

Wickson, M. E., Thimann, K. V. 1958. *Physiol Plant* 11:62-74.

Zadina, J., Jermoljev, E., 1976. Šlechtění bramboru. Academia. Praha, 359 s.

Zur, I., Dubas, E., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Janowiak, F., Wędzony, M. 2008. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale Wittm.*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2008) 94:319-328.

Internetové zdroje

ZPRÁVA O STAVU ZEMĚDĚLSTVÍ ČR ZA ROK 2014 „ZELENÁ ZPRÁVA“ dostupné na http://eagri.cz/public/web/file/418681/Zprava_o_stavu_zemedelstvi_CR_v_roce_2014.pdf

9 Seznam použitých zkratek

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

BAP - 6-benzylaminopurin

BBA – Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft)

BSA - Bundessortenamt

DAPI - 40, 6-diamidino-2-fenylindoldihydrochlorid

GA3 - kyselina gibberelová

IAA - kyselina indolyl-3-octová

IBA – kyselina β -indolyl- γ -máselná

IVA – Industrieverband Agrar

KOH - hydroxid draselný

MS 50% - Murashige a Skoog médium (1962) poloviční koncentrace živin

MS 100% - Murashige a Skoog médium (1962) plná koncentrace živin

RR – růstové regulátory

SH 50% - Schenk a Hildebrandt médium (1972) poloviční koncentrace živin

SH 100% - Schenk a Hildebrandt médium (1972) plná koncentrace živin