

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Markéta Zálešáková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární aspekty androgeneze u
okurky seté (*Cucumis sativus* L.)**

Bakalářská práce

Markéta Zálešáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta ZÁLEŠÁKOVÁ**
Osobní číslo: **R17801**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Molekulární aspekty androgenese u okurky seté (*Cucumis sativus* L.)**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů
3. Kultivace prašníků *in vitro* a indukce androgenese
4. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů
5. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Anglické články z knihovny vedoucího.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.**
Katedra botaniky

Datum zadání bakalářské práce: 25. března 2019
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. března 2019

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Markéta Zálešáková

Název práce: Molekulární aspekty androgeneze u okurky seté (*Cucumis sativus* L.)

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: androgeneze, mikrospora, *in vitro* kultura, genová exprese

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

Androgeneze je proces, při kterém mikrospory nebo mladá pylová zrna přejdou v reakci na stres z normálního vývoje pylu na embryogenní dráhu. Prostřednictvím androgeneze lze vyprodukovat kompletní homozygotní rostliny a zkrátit tím časovou náročnost šlechtitelských programů. Účinnost produkce androgenních embryí však závisí na mnoha faktorech, jako je například genotyp rostliny, vývojové stádium pylu, typ stresového ošetření a kultivační podmínky. V této práci byla provedena indukce androgeneze chladem v prašnicích *Cucumis sativus* L. Za účelem pochopení molekulárních mechanismů přeprogramování mikrospor na embrya byla provedena analýza exprese vybraných genů u prašníků *in vitro* kultivovaných v chladu, dále u prašníků kultivovaných bez působení chladu a byla porovnávána s expresí genů v čerstvých prašnicích. Testovanými geny byly CAT, APX, GPX, LOXC1, LOXC2, které jsou zapojeny do buněčné odpovědi na stres, dále gen PCNA spojený s proliferačními procesy a gen XTH podílející se na modifikacích buněčné stěny. Největší změny exprese byly zaznamenány u prašníků, které nebyly kultivovány v chladu. Pro lepší porozumění molekulárních aspektů přímo spojených s indukcí androgeneze je třeba dalších výzkumů.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Markéta Zálešáková

Title: Molecular aspects of androgenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Botany Faculty Of Science, Palacky University in Olomouc

Supervisor: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: androgenesis, microspore, *in vitro* culture, gene expression

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary

Androgenesis is the process by which microspores or young pollen grains are switched from normal pollen development towards an embryogenic pathway in response to stress. Complete homozygous plants can be produced by androgenesis, thus shortening the time required for breeding programs. However, the efficacy of androgen embryo production depends on many factors, such as plant genotype, pollen developmental stage, type of stress treatment, and culture conditions. In this work, cold induction of androgenesis was performed in anthers of *Cucumis sativus* L. In order to understand the molecular mechanisms of microspore reprogramming into embryos, expression of selected genes was analyzed in anthers cultured in vitro in cold and without cold and analyzed with gene expression in fresh anthers. The genes tested were CAT, APX, GPX, LOXC1, LOXC2, which are involved in the cellular response to stress, as well as the PCNA gene associated with proliferative processes and the XTH gene involved in cell wall modifications. The largest changes in expression were observed in anthers that were not cultured in the cold. Further research is needed to better understand the molecular aspects directly related to the induction of androgenesis.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vladana Ondřeje, PhD. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, PhD. za odborné vedení, věcné připomínky, čas a rady při zpracování mé bakalářské práce. Poděkování patří také Mgr. Lucii Vaculné a kolektivu katedry botaniky za ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině, za podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Androgeneze	3
3.2	Indukce androgeneze: role stresu	4
3.3	Molekulární aspekty androgeneze.....	6
3.4	Exprese genů zapojených do buněčné odpovědi na stres.....	8
3.4.1	<i>Lipoxygenáza</i>	9
3.4.2	<i>Kataláza</i>	10
3.4.3	<i>Glutathionperoxidáza</i>	11
3.4.4	<i>Askorbát peroxidáza</i>	12
3.5	Exprese genů zapojených do proliferačních procesů a modifikací buněčné stěny 13	
3.5.1	<i>Proliferační buněčný jaderný antigen</i>	13
3.5.2	<i>Xyloglukan endotransglukosyláza/hydroláza</i>	15
4	MATERIÁL A METODY.....	16
4.1	Biologický materiál.....	16
4.2	Vybavení laboratoře	16
4.3	Seznam použitých chemikálií	17
4.4	Seznam použitých roztoků a růstových médií	17
4.5	Seznam použitých komerčních kitů	18
4.6	Izolace prašníků a jejich kultivace	19
4.7	Příprava mikroskopických preparátů	19
4.8	Izolace RNA.....	19
4.9	Elektroforetická separace	20
4.10	Reverzní transkripce.....	20
4.11	PCR reakce.....	21
4.12	Použité primery a jejich navržení.....	21
4.13	Real-time PCR	22
5	VÝSLEDKY	24
5.1	Výsledky studií androgenního vývoje.....	24
5.2	Analýza exprese genů	25

5.2.1	<i>Expres genů zapojených do buněčné odpovědi na stres</i>	<i>27</i>
5.2.2	<i>Expres genů zapojených do proliferačních procesů a modifikací buněčné stěny 30</i>	
6	DISKUZE	33
7	ZÁVĚR	36
8	LITERATURA.....	37

SEZNAM ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbát peroxidáza
BBM	gen BABY BOOM
CAT	kataláza
DHL	homozygotní dihaploid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GPX	glutathion peroxidáza
GST	glutathion S-transferáza
HSP	protein teplotního šoku (<i>heat shock protein</i>)
LOX	lipoxygenáza
MDE	embryo odvozené od mikrospor
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
ROS	reaktivní forma kyslíku
XTH	xyloglukan endotransglykosyláza / hydroláza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Vývoj pylu: role stresu.

Obrázek č. 2: Velikost poutat *C. sativus* L. před izolací prašníků.

Obrázek č. 3: Jednojaderné mikrospory *C. sativus* L. ihned po izolaci.

Obrázek č. 4: Dvoujaderné mikrospory *C. sativus* L. po 96 hodinách kultivace v chladu.

Obrázek č. 5: Elektroforetická separace vyizolované RNA z prašníků.

Obrázek č. 6: Elektroforetická separace produktů PCR reakce s první sadou primerů pro studované geny.

Obrázek č. 7: Elektroforetická separace produktů PCR reakce s druhou sadou primerů pro studované geny.

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Změna exprese genu CAT v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 2: Změna exprese genu APX v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 3: Změna exprese genu GPX v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 4: Změna exprese genu LOXC1 v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 5: Změna exprese genu LOXC2 v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 6: Změna exprese genu XTH v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

Graf č. 7: Změna exprese genu PCNA v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek

SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1: Seznam použitých roztoků a růstových médií.

Tabulka č. 2: Složení Gamborg B5 média, převzato z Gamborg et al. 1968.

Tabulka č. 3. Reakční podmínky reverzní transkripce.

Tabulka č. 4: Časový a teplotní profil PCR reakce.

Tabulka č. 5: Primery amplifikující oblasti sledovaných genů.

Tabulka č. 6: Složení RT-PCR mixu pro 1 vzorek.

Tabulka č. 7: Časový a teplotní profil real-time PCR.

1 ÚVOD

Okurka setá (*Cucumis sativus* L) čeledi *Cucurbitaceae* patří mezi deset hospodářsky nevýznamnějších rostlin. Navzdory schopnosti okurky růst za velmi širokého spektra klimatických a půdních podmínek, hmyzí škůdci a choroby virového, bakteriálního a plísňového původu přispěli k významnému snížení výnosu. Produktivitu plodin lze výrazně zvýšit použitím hybridů, které se získávají křížením čistých linií s některými definovanými vlastnostmi. Čisté linie jsou pro programy šlechtění rostlin neocenitelné například při testování odolnosti rostlin vůči chorobám. Konvenční metodou získávání čistých linií byla tradičně aplikace po sobě jdoucích kol samooplození a selekce, obvykle vyžadujících až 10 generací pro dosažení vysokého stupně homozygotnosti. Vyžadovala tedy značné množství času a zdrojů. V moderních šlechtitelských programech se používají různé postupy, které jsou zdrojem haploidů a homozygotních dihaploidů DHL, jako je například *in vitro* gynogeneze (během *in vitro* kultivace vajíček / vaječnicků) a *in vitro* androgeneze (během *in vitro* kultivace mikrospor / prašníků) (Dong *et al.*, 2016).

Potenciál androgeneze v produkci DHL rostlin je vysoký, protože jeden prašík obsahuje více než tisíc mikrospor a z každé z nich se může vyvinout nová rostlina. Proces probíhá za umělých laboratorních podmínek, kde se mladá pylová zrna vyvíjejí na haploidní rostliny s polovinou normálního počtu chromozomů. Mikrospory se tvoří meiotickým dělením, které způsobuje jejich genetickou diverzifikaci. Spontánní nebo indukované zdvojnásobení haploidního genomu vede k plné homozygotnosti regenerovaných rostlin (Weigt *et al.*, 2019).

Protože existuje mnoho faktorů ovlivňujících účinnost androgenetické indukce, je obtížné vyvinout účinnou metodu regenerace rostlin z mikrosporových / prašíkových kultur. Dosud byly zkoumány různé aspekty indukce androgeneze, ale o molekulárních mechanismech spojených s tímto vývojovým přepínačem je známo jen málo.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma androgeneze a její molekulární aspekty popsáním funkce vybraných genů. Praktická část je zaměřena na techniku izolace a *in vitro* kultivace prašnickových kultur *Cucumis sativus* L. za účelem indukce androgeneze. Dalším cílem práce je analýza exprese vybraných genů v prašnicích kultivovaných *in vitro* za různých podmínek.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 ANDROGENEZE

Při sexuální reprodukci vede fúze samčí a samičí haploidní gamety k vytvoření diploidního embrya. Oba rodiče přispívají stejným způsobem k jadernému genomu embrya. Naproti tomu cytoplazmatický genom (mitochondriální a chloroplastický) je výhradně ženského původu. Androgeneze je zvláštní forma rozmnožování, kdy dochází k vývoji haploidního embrya pouze ze samčí pohlavní buňky. Samec je tedy jediným zdrojem genetické informace. Jedná se o vzácnou alternativu k sexuální reprodukci, přirozeně se vyskytující například u cypřiše tassilského (*Cupressus dupreziana*). V přírodě lze pozorovat dva druhy androgeneze. U prvního typu se spojí spermatická buňka s vaječným jádrem, při čemž je jaderný genom matky eliminován otcovským genomem. U druhého typu samice produkuje vaječné buňky bez jádra a po oplození samčí gametou vznikne embryo, jehož celý jaderný genom je otcovského původu (Schwander a Oldroyd 2016). Oba typy androgeneze vyžadují životaschopnost jedince v haploidním stavu nebo diploidizaci otcovského genomu. V některých případech může dojít u haploidních jedinců ke spontánnímu zdvojnásobení počtu chromozomů během velmi raných stadií embryogeneze. Jinak lze duplikace dosáhnout polyspermickým oplodněním nebo také produkcí neredukovaných gamet (Morgado-Santos *et al.*, 2017).

Opakem androgeneze je gynogeneze. Embryonální genom je pouze mateřského původu, i když je pro stimulaci embryogeneze nutná samčí gameta. Gynogeneze a androgeneze jsou pro pěstitele rostlin velmi zajímavé, protože lze v jedné generaci dosáhnout úplných homozygotních linií, čímž se zkrátí časová náročnost šlechtitelských programů (Dunwell 2010). Eliminace jednoho z rodičovských genomů vede k vývoji haploidních jedinců, kteří pak mohou být diploidizováni procesem zdvojení chromozomů. Navíc androgeneze může mít vliv na cytoplazmatickou pylovou sterilitu (Budar a Pelletier 2001). K vyvolání umělé gynogeneze a androgeneze se využívají biotechnologické přístupy *in vitro*, jako jsou kultury prašníků a izolované kultury mikrospor, které se vyvinou ve strukturu kalusu a / nebo embrya. (Jähne a Lörz 1995).

Mikrospory, tj. nezralá pylová zrna, která tvoří synchronní množství haploidních buněk s morfogenním potenciálem, přitahovaly pozornost biotechnologů jako zdroje pro zvýšení produkce haploidů nebo transgenních rostlin. Ačkoli je kultura prašníků v této oblasti perspektivní metodou, je třeba ještě vytvořit účinný protokol pro systém nezávislý

na genotypu. Mezi nejkritičtější faktory pro produkci embryonálních struktur a následnou regeneraci rostlin patří sběr poupat v optimálním stadiu, stresové ošetření, složení média a kultivační podmínky, genotyp a růstové podmínky dárcovských rostlin (Lantos *et al.*, 2012). Přírozené podmínky pro kvetení (intenzita světla, délka dne, teplotní režim, vlhkost atd) jsou pro dárcovské rostliny obvykle nejlepším prostředím k produkci prašníků pro úspěšné regenerační experimenty. Jakákoli infekce nebo stres dárcovských rostlin povede k menšímu úspěchu nebo úplnému selhání při vyvolání androgeneze a další regeneraci. Jakmile byl vybrán vhodný dárcovský materiál, musí být vývoj mikrospor změněn z gametofytické dráhy na sporofytický vývoj (Wang *et al.*, 2000). Objev, že stresové ošetření působí jako spouštěč měnící směr vývoje mikrospor, se stal zlomovým bodem, který výrazně zvyšuje účinnost mnoha protokolů. Nízké nebo vysoké teploty, nedostatek sacharidů / dusíku nebo osmotická nerovnováha patří mezi nejčastější stresová opatření na začátku pěstování mikrosporových kultur (Žur *et al.*, 2008).

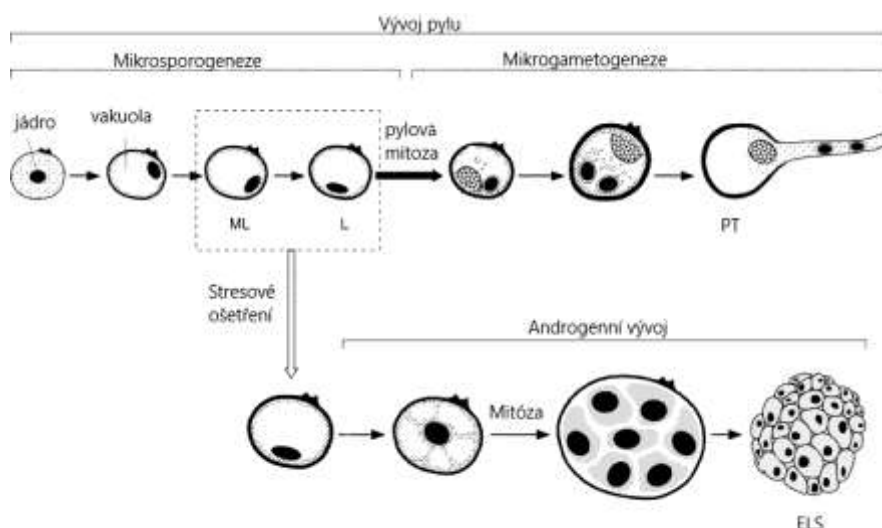
Ne všechny hospodářsky významné plodiny účinně reagují na indukci androgeneze. Pouze v několika z nich je androgenní potenciál dost vysoký na to, aby získal dostatečný počet životaschopných embryí a mohl být rutinně používán v produkci haploidních linií pro šlechtitelské programy. Druhy jako řepka, tabák, ječmen nebo pšenice jsou dostatečně citlivé, aby byly považovány za modelové systémy. Avšak jiné vědecky nebo ekonomicky zajímavé druhy, jako je *Arabidopsis* nebo rajče, jsou i nadále nevhodné k indukci haploidní embryogeneze (Seguí-Simarro 2010).

3.2 INDUKCE ANDROGENEZE: ROLE STRESU

Technika izolované kultury mikrospor, prováděná odstraňováním somatické tkáně prašníků, vyžaduje lepší vybavení a více dovedností ve srovnání s kulturou prašníků. Během úspěšné stresové předúpravy celých prašníků jsou pozorovány změny ve vlastnostech buněčné stěny pletiva. Vyvíjející se mikrospory jsou lokalizovány ve vnitřní vrstvě výstelkového pletiva prašníku. Místo lemuje vrstva výživných buněk neboli tapetum. Buňky ve střední vrstvě výstelkového pletiva obsahují chlorofyl. U prašníků předem ošetřených stresem byla pozorována rychlá ztráta chlorofylu a degenerace tapeta a buněk stěny prašníku. Tapetum je specializovaná buněčná vrstva mezi sporogenní tkání a prašnou stěnou, která funguje jako zdroj živin pro vývoj pylových zrn. Během stresového ošetření jsou tyto typy buněk zjevně nejcitlivější na stres a vstupují do programované buněčné smrti. Degradací produkty složek buněčné stěny z buněk tapeta

by mohly být v tomto procesu považovány za signální molekuly pro citlivé mikrospory, které vstupují do sporofytické vývojové dráhy (dediferenciace a dělení) (Wang *et al.*, 2000).

Fáze vývoje pylu je komplexní faktor, který silně ovlivňuje úspěch přeprogramování vývoje mikrospor. Před kultivačním procesem *in vitro* pro indukci androgeneze je tedy vhodné identifikovat velikost pupenů nebo prašníků s nejvyšším podílem mladého pylu. Vývoj pylu lze rozdělit na dva hlavní procesy: mikrosporogenezi a mikrogametogenezi. Mikrosporogeneze začíná meiosou pylových mateřských buněk a končí tvorbou haploidních mikrospor. První pylová mitóza zahajuje mikrogametogenezi (viz obrázek č. 1), kde asymetrické dělení vede ke generativní buňce zabudované do velké vegetativní cytoplazmatické buňky. Vegetativní a generativní buňky se výrazně liší, protože malá generativní buňka s vysoce kondenzovaným chromatinem v jádře podstoupí další mitotické dělení, aby vytvořila dvě spermatické buňky, zatímco vegetativní buňka zůstane v G₁ fázi buněčného cyklu, kde zahájí intenzivní program akumulace zásobních produktů jako jsou škrob a lipidy a řídí další dozrávání pylu. Vystavení stresu kolem první pylové mitózy (viz fáze ML–L, obrázek č. 1) postačuje k tomu, aby mikrospory přešly na embryogenní cestu vývoje, tedy androgenezi. Pokud se ve vegetativní cytoplazmě dvoujaderného pylu začne hromadit škrob, androgenezi již nelze spustit (Touraev *et al.*, 1997).



Obrázek č. 1: Vývoj pylu: role stresu. Mikrospory ML–L představují responzivní fázi pro indukci androgeneze; PT-růst pylové láčky; ELS-vznik embryonální struktury. Převzato a upraveno dle: S. de F. Maraschin *et al.*, (2006).

Je známých několik typů stresových předúprav, které účinně vyvolávají androgenezi. Obvykle sestávají z vystavení celých rostlin *in vivo*, pupenů, prašníků a izolovaných mikrospor *in vitro* nedostatku základních prvků, tepla, chladu nebo osmotickému šoku. Při stresu se mikrospory zvětšují a cytoplazma je charakterizována nedostatkem akumulovaného škrobu a lipidů, přítomností oblastí bez organel v cytoplazmě a celkovým poklesem počtu ribozomů. Po dediferenciaci cytoplazmy jádro migruje směrem do středu buňky, zatímco velká centrální vakuola je rozdělena na fragmenty, které jsou rozptýleny radiálně orientovanými cytoplazmatickými vlákny. Výsledná morfologie je často nazývána hvězdicovou strukturou. Dále dochází k replikaci DNA a jádro znovu vstoupí do buněčného cyklu (vznik dvou jader vegetativního typu stejné velikosti místo jednoho vegetativního a jednoho generativního) (S. F. Maraschin *et al.*, 2005).

Po předběžném ošetření jsou mikrospory kultivovány ve specifickém kultivačním médiu, kde dochází k buněčnému dělení a tvorbě mnohobuněčných struktur uvnitř exiny. V následující fázi jsou tyto struktury z exiny uvolňovány a vyvíjí se podobným způsobem jako zygotická embrya. V závislosti na genotypu je často pozorována duplikace haploidního genomu, častěji během prvních dělení embryogenní mikrospory, a to většinou prostřednictvím mechanismu jaderné fúze (Germanà 2011).

3.3 MOLEKULÁRNÍ ASPEKTY ANDROGENEZE

Analýza biochemických a molekulárních změn během stresového ošetření k vyvolání androgeneze byla ústředním bodem výzkumu směrem k pochopení mechanismů zapojených do přeprogramování mikrospor na embrya. Většina genů, u nichž bylo zjištěno, že se během stresového ošetření odlišně exprimují k indukci androgeneze, se podílí na stresových hormonech, buněčné ochraně před stresem, metabolismu sacharóza-škrob a proteolýze. Tyto výsledky naznačují, že získávání androgenního potenciálu do značné míry závisí na dediferenciaci, což je proces, při kterém jsou stávající transkripční a translační profily pravděpodobně odstraněny nebo změněny, aby byla místo vývoje pylu spuštěna embryogenní cesta. Změny genové exprese lze rozdělit do tří hlavních kategorií: buněčná odpověď na stres, potlačení gametofytického programu a exprese embryogenního programu.

Je známo, že rostlinné buňky jako odpověď na stres produkují kyselinu abscicovou (ABA), jejíž signální kaskáda může hrát důležitou roli při aktivaci specifických programů genové exprese během iniciace androgeneze stresem (Seguí-Simarro 2010). Což bylo

dokázáno například po zahájení androgenese u pšenice, kde byla detekována exprese genu EcMt. Promotorová oblast EcMt genu z pšenice obsahuje prvek reagující na ABA a jeho regulace během androgenese úzce souvisí s vrcholem endogenní produkce ABA. Pravděpodobně se tedy ABA podílí přinejmenším na dvou různých procesech: (a) předcházení buněčné smrti mikrospor, čímž se zvyšuje počet životaschopných mikrospor během stresového ošetření a (b) potlačení dalšího vývoje mikrospor na zralý pyl. Protože experimenty zahrnující měření ABA během stresového ošetření byly prováděny na tkáni prašníků, není jasné, které buňky produkují stresem indukovanou ABA (Wang *et al.*, 2000).

V souvislosti s buněčnou reakcí na stres byly u několika druhů popsány změny hladin různých proteinů tepelného šoku (HSP). Vzhledem k jejich chaperonové aktivitě je možné, že HSP hrají nepřímou roli při spouštění androgenese prostřednictvím řízení subcelulární lokalizace dalších klíčových regulačních proteinů a / nebo poskytováním vyšší úrovně termotolerance. V současné době se předpokládá, že HSP mají cytoprotektivní roli související s tolerancí ke stresu. Další hlavní složka stresem indukované androgenese související s indukcí genů je glutathione S-transferáza (GST). GST geny kódují proteiny, které se účastní několika procesů, včetně detoxikace xenobiotik a ochrany před oxidačním stresem. Role genů GST během získávání embryogenního potenciálu bude pravděpodobně spojena s ochranou buňky před škodlivými účinky reaktivních kyslíkatých radikálů. Nelze však vyloučit možnost, že redoxní stav buněk a obsah glutathionu mohou mít důležitou roli ve vývojových procesech, zejména při spouštění buněčného dělení.

Kromě spuštění embryogenního programu musí buňka zrušit gametofytický program. Blokování syntézy škrobu (marker zrání pylu) a eliminace škrobových rezerv jsou v tomto procesu klíčovými událostmi. V mikrospórách ječmenu bylo pozorováno snížení počtu genů, jako jsou například sacharóza syntáza 1, fosfoglukomutáza, UDP-glukóza 4-epimeráza, podílejících se na biosyntéze a akumulaci škrobu, spolu s indukcí genů pro rozpad škrobu a sacharózy (S. de F. Maraschin *et al.*, 2006).

První indikací pro nástup embryogenního programu je symetrické dělení mikrospor na rozdíl od asymetrického dělení, které definuje první pylovou mitózu. Od této fáze se embryo odvozené z mikrospor progresivně přibližuje morfologii svého zygotického protějšku. Ukázalo se, že růstové regulátory, jako je ethylen, kyselina indol-3-octová nebo ABA, jsou důležité pro konkrétní aspekty vývoje embrya. Od zygotické

embryogeneze se liší buď časovými profily nebo absolutními hladinami. Tyto rozdíly a také vznik proliferačních struktur podobných kalusu pozorovaných u některých druhů, včetně tykvovitých, lze přičíst nepřítomnosti endospermu jako zdroji regulačních podnětů (Seguí-Simarro 2010).

Jak bylo popsáno výše, v souvislosti s indukcí androgeneze bylo identifikováno několik genů a proteinů spojených s metabolismem sacharóza-škrob, stresovými odpověďmi, proteolýzou a cytoprotekcí. Avšak žádný z nich nepatřil mezi klíčové regulační geny jasně zapojené do získávání embryogenního potenciálu mikrospor. Takové geny jsou exprimovány pouze tehdy, když je fáze dediferenciace vyvolaná stresem ukončena, což koreluje s obdobím tvorby mnohobuněčných struktur na začátku kultivace. Gen BABY BOOM (BBM) byl izolován z androgenních řepkových mnohobuněčných struktur a je přednostně exprimován během androgeneze a zygotické embryogeneze. BBM tedy představuje první dosud identifikovaný gen, který má předpokládanou roli při koordinaci fáze iniciace dělení buněk během androgeneze. Dalším regulačním proteinem, o kterém se předpokládá, že hraje roli při iniciaci buněčného dělení během embryogeneze je AGAMOUS-like₁₅ (AGL₁₅). Ačkoli vývojová role AGL₁₅ je stále nejasná, ukázalo se, že AGL₁₅ se translokují do jádra při iniciaci buněčných dělení během zygotické a somatické embryogeneze a androgeneze (S. F. Maraschin *et al.*, 2005).

3.4 EXPRESE GENŮ ZAPOJENÝCH DO BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA STRES

Aerobní reakce v rostlinách, vedou k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxidový radikál (O_2^-), hydroxylový radikál (OH^\cdot) a peroxid vodíku (H_2O_2). Když je koncentrace ROS na přijatelně nízké úrovni, hraje důležitou signalizační funkci při růstu, vývoji, reakci na biotické a abiotické podněty prostředí a programované buněčné smrti. Zatímco vysoká koncentrace ROS je pro buňky škodlivá. Při biotickém nebo abiotickém stresu se může ROS v rostlinách dramaticky hromadit a vytvářet oxidační poškození. Rostliny vyvinuly některé enzymatické systémy vyrovnávající hladiny ROS jako jsou katalázy (CAT), askorbát peroxidázy (APX) a glutathion peroxidázy (GPX) (Fu 2014).

Další možnou obrannou reakcí rostlin na stres je produkce oxylipinů, které vznikají degradací volných mastných kyselin a esterifikovaných lipidů prostřednictvím lipoxygenáz (LOX).

3.4.1 Lipoxygenáza

Lipoxygenáza (LOX) známá také jako lipoxidáza a karoten-oxidáza je enzym patřící do třídy dioxygenáz, které katalyzují peroxidaci molekul obsahujících (Z, Z) 1,4-pentadienový systém za vzniku nenasyceného hydroperoxidu mastných kyselin. V rostlinách jsou nejčastějšími substráty pro LOX kyselina linolenová a linoleová. Kyslík může být přidán na kterýkoli konec pentadienového systému (regiospecificita). V případě linolových nebo linolenových kyselin to vede ke dvěma možným produktům, 9- a 13-hydroperoxy mastným kyselinám, které se rychle chemicky nebo enzymaticky přeměňují na skupinu produktů společně nazývaných oxylipiny, jako je traumatin, kyselina jasmonová a methyl jasmonát. Oxylipiny se podílejí na celé řadě důležitých fyziologických funkcí (X.-Y. Yang *et al.*, 2012).

Enzymatické reakce LOX bývají spojovány například s vývojovými stádii, v mobilizaci skladovacích lipidů během klíčení, obraně rostlin, odolnosti vůči škůdcům nebo může být využit jako zásobní protein během vegetativního růstu (Porta a Rocha-Sosa 2002). U fosfolipidové monovrstvy lipidových tělísek různých sazenic olejnin, včetně sazenic okurek, může být detekován speciální linoleát 13-LOX, který je schopen okysličovat esterifikované zbytky linoleátu bez předchozího působení lipidového hydrolyzujícího enzymu. Během časných stádií klíčení vede tato reakce k výraznému zvýšení obsahu hydroperoxidu v zásobních lipidech. Tato frakce okysličených mastných kyselin se uvolňuje z lipidových tělísek a podstupuje β -oxidaci. Podle tohoto scénáře by mobilizace zásobních lipidů mohla být zahájena ne lipázou, ale speciálním 13-LOX. Po analýze exprese genu kódující lipidové tělo 13-LOX bylo zjištěno, že není exprimován v klidovém stádiu semenech, ale je silně indukován během raných stádií klíčení. Imunocytochemické studie děložních lístků okurek odhalily specifickou lokalizaci enzymu na membráně lipidových tělísek během časných stádií klíčení (Feussner *et al.*, 2001).

Sekvenční analýza genomu okurky identifikovala přítomnost nejméně 23 sekvencí podobných LOX, z nichž devět patří do LOX typu 1, 13 patří do LOX typu 2 a jeden osiřelý gen. Čtrnáct genů LOX je specifických pro linii okurek. Většina genů LOX okurky (19 z 23) je distribuována do tří shluků, z nichž největší obsahuje 11 členů uspořádaných v tandemu. Ostatní sekvenované rostlinné genomy nevykazují žádné zřejmé shlukování LOX, s výjimkou vinné révy, která má jeden shluk s šesti kopiemi. Vzhledem k tomu, že okurka obsahuje pouze 61 genů rezistence, oproti *Arabidopsis* (200), topolu (398) a rýži

(600), může být rozšířená cesta lipoxygenázy doplňkovým mechanismem pro vypořádání se s biotickým stresem (Huang *et al.*, 2009).

Exprese genu LOX je regulována různými efekty, mezi které patří kyselina jasmonová, abscisová a také různými formami stresu, jako je poranění, nedostatek vody nebo napadení patogeny. Kromě toho geny LOX izolované z různých druhů rostlin vykazují odlišnou orgánově specifickou expresi. Během klíčení jsou nové LOX syntetizovány v sazenicích a děložních lístcích. Maximální akumulace LOX proteinu a odpovídajících mRNA trvá od několika hodin do několika dnů po vyklíčení. LOX mRNA syntetizované během klíčení lze také nalézt ve zralé rostlině (Porta a Rocha-Sosa 2002).

3.4.2 Kataláza

Kataláza (CAT) je tetramerový enzym s oxidoreduktázovou aktivitou vyskytující se téměř ve všech živých organismech vystavených kyslíku. Skládá se ze čtyř porfyrinových hemových skupin na molekulu. Typická katalázová reakce zahrnuje rozklad dvou molekul peroxidu vodíku (H_2O_2) na vodu (H_2O) a kyslík (O_2), přičemž optimální pH je v rozsahu od 4 do 11. CAT je také vysoce efektivní, za sekundu dokáže rozložit miliony molekul peroxidu vodíku (Ighodaro a Akinloye 2018). Enzym se nachází přednostně v peroxisomech. Je také detekována v cytosolu, mitochondriích a chloroplastech. CAT hraje klíčovou roli ve vývoji rostlin, obraně a stárnutí. Zachycuje H_2O_2 generovaný během mitochondriálního přenosu elektronů, β -oxidaci mastných kyselin, a hlavně fotorespirační oxidaci. Nedostatek nebo mutace enzymu je spojena s různými chorobnými stavy a abnormalitami.

Katalázy, které mají více strukturních izoforem, jsou rozděleny do dvou skupin podle molekulární struktury a homologii aminokyselin. Skupina I se skládá ze dvou 55 kDa a dvou 59 kDa podjednotek, s jedinečnými aminokyselinovými sekvencemi Ser – Arg – Leu. Skupina II se skládá ze čtyř 55 kDa podjednotek s jedinečnou aminokyselinovou sekvencí Ser – Ser – Ser. Různí členové rodiny CAT vykazují variabilní vzorce exprese v rostlinách (Sun *et al.*, 2018).

Úroveň transkripce různých rostlinných kataláz je časově i prostorově regulována a reaguje odlišně na vývojové a exogenní podněty. Katalázy třídy I jsou silně exprimovány v listech s nepostradatelnou fotorespirační funkcí, zatímco katalázy třídy II jsou spojeny s vaskulárními tkáněmi a mohou hrát roli při lignifikaci. Jejich přesná biologická funkce však zůstává neznámá. Katalázy třídy III jsou zejména exprimovány

v semenech a reprodukčních tkáních a jejich aktivita je spojena s odstraňováním nadměrného peroxidu vodíku vznikajícího během degradace mastných kyselin v glyoxylátovém cyklu v glyoxysomech (Mhamdi *et al.*, 2010). Kataláza rostlin je obvykle kódována malou rodinou genů. *Arabidopsis*, tabák, kukuřice a dýně obsahují tři členy této rodiny a dva z nich byly identifikovány v bavlníkových semenech. Okurka obsahuje čtyři geny CAT (CsCAT1-CsCAT4), tj. o jeden více než u výše uvedených druhů. Fylogenetická analýza ukázala, že CsCAT1-CsCAT3 úzce souvisí s *Arabidopsis* AtCAT1 – AtCAT3, ale u CsCAT4 nebyl pozorován žádný zřejmý protějšek. Dostupné důkazy nenaznačují velký rozdíl v biochemických vlastnostech mezi různými druhy kataláz. Genové sekvence vykazují vysokou podobnost (Z. Yang *et al.*, 2019).

Analýza exprese prokázala, že CsCAT1 a CsCAT2 jsou reprezentovány transkripty ve fotosyntetických pletivech, jako jsou listy, ale také v kořenech a plodech. CsCAT3 vykazoval přepisy v květech a také ve stoncích a listech. Identifikace a organizace transkriptu CsCAT1 v celém genomu se výrazně zvýšila chladem, suchem, působením kyseliny abscisové a oxidačním ošetřením. Transkripce CsCAT2 byla snížena v reakci na sucho. Podobně byla transkripce CsCAT3 zvýšena za podmínek zvýšené koncentrace soli a sucha a snížena za působení stresu kyselinou abscisovou (Hu *et al.*, 2016).

3.4.3 Glutathionperoxidáza

Glutathionperoxidázy (GPX) jsou skupinou enzymů, které chrání buňky před oxidačním poškozením způsobeným reaktivními druhy kyslíku (ROS). GPX jsou selen-dependentní enzymy, pro jejichž funkci je nezbytný glutathion jako kofaktor. Glutathion působí jako redoxní senzor exogenních podnětů a je součástí více regulačních procesů koordinujících expresi obranných genů.

GPX katalyzuje redukci peroxidu vodíku, nebo jiných organických peroxidů na vodu a odpovídající alkoholy. U savců existuje nejméně pět izoform GPX, které se liší strukturou, specificitou substrátu a subcelulární a tkáňovou distribucí. Naše znalosti o rostlinných GPX jsou však omezenější. Byly nalezeny v cytosolu a chloroplastech, ale vysoké hladiny ROS se mohou vyskytovat v různých kompartmentech buňky, včetně peroxisomu, mitochondrie, glyoxysomu, endoplazmatického retikula a apoplastu. U těchto organel byly nalezeny jiné enzymy antioxidačního systému (např. askorbát peroxidáza, glutathion reduktáza), proto je taky pravděpodobné, že existují další členové genové rodiny GPX. Při zkoumání genové rodiny GPX u bavlníku (*Gossypium hirsutum*)

byla zjištěna zvýšená úroveň exprese genu GhGPX1 u květů a listů, což je v souladu s vysokými koncentracemi glutathionu v chloroplastech a naopak jeho nízkými hladinami v kořenech a stoncích (Chen *et al.*, 2017).

Zdá se, že hlavní funkcí GPX v rostlinách je zachycování fosfolipidových hydroperoxidů, a tím ochrana buněčných membrán před peroxidačním poškozením. S tím souvisí také zvýšení exprese mnoha GPX v reakci na abiotické a biotické stresy, včetně slanosti, toxicity těžkých kovů a infekce bakteriálními nebo virovými patogeny (Ramos *et al.*, 2009). Bylo také dokázáno, že GPX lze použít ke zlepšení růstu vyvíjejících se rostlin ve stresových podmínkách. Nadměrná exprese glutathion S-transferázy (GST) s aktivitou GPX zlepšila růst sazenic transgenního tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) vystaveného chladovému stresu a vysoké koncentraci soli (Milla *et al.*, 2003).

3.4.4 Askorbát peroxidáza

Askorbát peroxidáza (APX) patří do skupiny hemperoxidáz I. třídy, které katalyzují redukci peroxidu vodíku s využitím askorbátu jako specifického elektronového donoru, při čemž vzniká dehydroaskorbát a voda. Askorbát je fyziologicky důležitý antioxidant, který zmírňuje oxidační stres a následné oxidační poškození proteinů a jiných makromolekul v buňce. Je známo, že askorbát reaguje s ROS přímo v roztoku (Ma a Davidson 2017). V případě nepřítomnosti askorbátu je aktivita izoenzymů APX labilní. Vysoká hladina endogenního askorbátu je tedy nezbytná pro účinné udržování antioxidantního systému, který chrání rostliny před oxidačním poškozením.

Různé izoformy APX jsou přítomny v různých subcelulárních kompartmentech, a jsou klasifikovány podle jejich subcelulární lokalizace. Rozpustné izoformy se nacházejí v cytosolu, mitochondrii a chloroplastu, zatímco na membrány vázané izoformy se nacházejí v mikrobodech (včetně peroxisomu a glyoxysomu). Přítomnost organelicky specifických peptidů a transmembránových domén nacházejících se v N a C-terminálních proteinových oblastech určuje konečnou subcelulární lokalizaci isoenzymu.

Enzymy APX jsou v rostlinách kódovány malými rodinami genů. Z devíti genů APX identifikovaných v *Arabidopsis* bylo zjištěno, že tři byly kódovány v cytosolu, zatímco dalších šest bylo distribuováno ve stromě, thylakoidu a peroxisomu. V rýži byly chloroplastické izoformy exprimovány třemi geny, cytosolické a peroxisomální formy byly kódovány dvěma geny a jeden gen byl pro mitochondriální APX (Ozyigit *et al.*, 2016). Exprese APX kódujících genů je modulována různými podněty jako je sucho,

vysoká koncentrace soli, vysoká nebo nízká teplota, kyselina abscisová, peroxid vodíku a napadení patogenem. Dále je transkripční exprese genů APX závislá na tkáni a vývojovém stádiu (Caverzan *et al.*, 2012).

3.5 EXPRESE GENŮ ZAPOJENÝCH DO PROLIFERAČNÍCH PROCESŮ A MODIFIKACÍ BUNĚČNÉ STĚNY

Za účelem indukce mikrospor směrem k embryogenezi je třeba aktivace určitých genů, které se účastní buněčného dělení, diferenciaci a morfogeneze pro vznik plně vyvinutého embrya. Jedním z nezbytných genů pro replikaci DNA je například proliferační buněčný jaderný antigen (PCNA). Pro růst a diferenciaci rostlin je dále nutná řízená přestavba polymerních sítí buněčných stěn, která způsobí změny v jejich mechanických vlastnostech a umožní dělení a expanzi buněk (Testillano 2019). Mezi enzymy podílejícími se na metabolismu buněčných stěn a její plasticity patří xyloglukanové endotransglukosylázy / hydrolázy (XTH).

3.5.1 Proliferační buněčný jaderný antigen

Gen PCNA kóduje proliferační protein buněčného jaderného antigenu (PCNA). Tento protein se vyskytuje u všech eukaryot a také archeí a je jednou z centrálních molekul odpovědných za rozhodování o životě a smrti buňky. Pokud je PCNA nefunkční, chybí nebo je v buňce přítomen v malém množství, dochází k apoptóze (Paunesku *et al.*, 2009). Zásadní roli hraje PCNA při metabolismu nukleových kyselin jako součást replikačního a opravného aparátu. Patří tak do rodiny DNA Sliding clamps (klouzavých svorek). V posledních letech se ukázalo, že PCNA interaguje s proteiny podílejícími se na progresi buněčného cyklu, které nejsou součástí aparátu DNA polymerázy a že se může účastnit transkripce RNA a sestavování chromatinu.

Nejlépe pochopená funkce PCNA je dosud role v replikaci DNA. PCNA tvoří svorku kolem DNA, na kterou ukotvuje polymerázu δ / ϵ a další proteiny replisomu. Pouze přítomnost PCNA na replikační vidličce umožňuje výměnu DNA polymerázy α za další polymerázy pokračující v syntéze DNA. Vazba PCNA na 3' konec primeru zabraňuje opětovnému navázání DNA polymerázy α a působí jako signál pro rekrutaci DNA polymerázy δ a ϵ . Po nanesení polymeráz na DNA se komplex DNA polymeráza δ / ϵ – PCNA pohybuje podél templátového vlákna, přičemž syntéza DNA probíhá souběžně na předním a zaostávajícím řetězci, a to nepřetržitě a diskontinuálně. Lokalizace PCNA na

DNA umožňuje stabilizaci, navazování a výměnu různých replikačních proteinů, čímž se stává klíčovým koordinátorem procesu replikace (Strzalka a Ziemienowicz 2011).

Během životního cyklu rostlin buňky procházejí určitým počtem dělení. Vzhledem k neustálému vystavování rostlin škodlivým faktorům (endogenním a exogenním) může být genetický materiál poškozen různými způsoby. Hromadění spontánních nebo indukovaných mutací během četných buněčných dělení hrozí narušením správného fungování organismu. Biologický účinek mutagenních činidel závisí na typu poškození DNA, které způsobují, a může vést k nekontrolované buněčné proliferaci nebo buněčné smrti. Bohužel je role rostlinné PCNA v opravě DNA špatně charakterizována a existující data prokazující její význam během opravy jsou nepřímá. Podezření na roli rostlinného PCNA při opravě bylo způsobeno hlavně identifikací a analýzou rostlinných proteinů, u nichž bylo prokázáno, že kvasinkové a živočišné homology zapojené do opravných systémů DNA interagují s PCNA. Tyto studie naznačují, že klíčová role PCNA při opravě DNA je prováděna prostřednictvím její interakce, nejen s DNA pol δ / ϵ během re-syntézy DNA, ale také s jinými opravnými proteiny DNA.

Správná regulace buněčného cyklu je klíčovým prvkem řízení buněčného dělení. Do tohoto procesu je zapojeno mnoho proteinů, včetně cyklinů a cyklin-dependentních kináz, které regulují přesný přechod buňky přes fáze buněčného cyklu. PCNA interaguje s několika proteiny eukaryotického buněčného cyklu (Koundrioukoff *et al.*, 2000). Poškození DNA a stárnutí buněk vedou k produkci proteinu p21, který blokuje přechod z fáze G1 do fáze S. Protein p21, který byl identifikován v komplexu tvořeném PCNA, cykliny a cyklin-dependentními kinázami, dosahuje tohoto zastavení buněčného cyklu mezi G1 a S fází inhibicí aktivity cyklin-dependentních kináz. Rostlinný homolog proteinu p21 nebyl dosud identifikován, ale je zajímavé, že rostlinné proteiny PCNA jsou schopny interagovat s lidským p21 (Strzalka a Ziemienowicz 2011).

Expresí genů PCNA ve všech organismech je v korelaci s buněčnou proliferací, a tedy se syntézou DNA během replikace genomu v S fázi buněčného cyklu. U kukuřice byly PCNA1 a PCNA2 geny exprimovány v kořenových špičkách a v mladých klasech, ale nikoli v listech nebo pylu (Strzalka *et al.*, 2010). V diferencovaných buňkách je PCNA neaktivní, avšak v průběhu kultivace protoplastů dochází k demethylaci lokusů a expresi PCNA po 48 hodinách (Cápal 2012). Gen PCNA tak může být považován za marker úspěšné kultivace, diferenciací a regenerace rostlinných protoplastů (Korhoňová 2011).

3.5.2 Xyloglukan endotransglukosyláza/hydroláza

Primární buněčná stěna vyšších rostlin obsahuje několik polysacharidů, včetně celulózy, hemicelulózových polysacharidů a alespoň tři tříd pektických polysacharidů. Nejhojnější hemicelulózou je xyloglukan, který se váže na celulózové mikrofibrily. V primární buněčné stěně úzké spojení xyloglukanu s celulózou vede k vytvoření sítě, která působí jako dynamická struktura, zabraňuje prasknutí buňky pod vnitřním tlakem turgoru, a přitom umožňuje růst v kontrolovaném, orientovaném módu (York *et al.*, 2004). Kromě toho produkty metabolismu buněčné stěny, jako jsou oligosacharidy, mohou také sloužit jako signální molekuly regulující vývojové programy. Předpokládá se, že změna strukturních vlastností buněčné stěny a produkce signálních molekul od ní odvozených, jsou nezbytnými faktory jakékoli vývojové metabolické aktivity v rostlinných buňkách.

Mezi enzymy podílející se na metabolismu buněčné stěny patří xyloglukanové endotransglukosylázy / hydrolázy (XTH), jejichž enzymatická aktivita je odpovědná za plasticitu buněčné stěny a produkci oligosacharidů odvozených od xyloglukanu, které za určitých fyziologických podmínek vykazují regulační aktivitu. XTH jsou apoplastické enzymy mající jak aktivitu xyloglukan endotransglukosylázy (XET), tak aktivity xyloglukan endohydrolázy (XEH). Zatímco aktivita XET může být odpovědná jak za uvolnění, tak posílení buněčné stěny spojením zesilujících mikrofibril, aktivita XEH může sama o sobě přispívat pouze k uvolnění stěny (Olsen *et al.*, 2016). Kromě toho jsou některé proteiny kódované členy rodiny XTH lokalizovány nejen v buněčné stěně, ale také v buněčné přepážce během cytokineze, což naznačuje jejich funkci v procesu dělení buněk (Yokoyama a Nishitani 2001).

XTH genové rodiny patří do šestnácté skupiny glykosidickými hydroláz a jsou na základě svých strukturních vlastností rozděleny do tří podrodin: I, II a III. Hlavní diverzifikace v rodině XTH je spojena se specializací orgánově specifické exprese a schopnosti reagovat na hormonální signály (Malinowski *et al.*, 2004). Exprese genu je dramaticky zvýšena v reakci na několik podnětů prostředí (včetně dotyku, větru, tmy, tepelného šoku a studeného šoku), tak i na hormony zvyšující růst, auxiny a brassinosteroidy (Xu *et al.*, 1996). U okurek geny Cs-XTH1 a Cs-XTH3 kódující proteiny XTH, byly nalezeny mezi četnými geny, které jsou diferencovaně exprimovány po indukci somatické embryogeneze okurek. Exprese těchto genů se zvýšila během somatické embryogeneze (Malinowski *et al.*, 2004).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Pro techniku androgeneze byly použity 30-45 dnů staré rostliny *Cucumis sativus* L. (odrůda Perseus, SEMO Ltd., Smržice, Česká republika), pěstované ve skleníku katedry botaniky UPOL. Poupata samčích květů byla odebírána na podzim 2019.

4.2 VYBAVENÍ LABORATOŘE

- NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, USA)
- Binokulární lupa (Olympus, Japonsko)
- Stolní pH metr FE-20 KIT (Mettler Toledo, Česká republika)
- Mikrovlnná trouba MS023 (Hitachi, Japonsko)
- UV Transiluminátor (UVITEC Cambridge, UK)
- Elektroforetická aparatura (Bio-RAD, USA)
- Digestoř (Merci ®)
- Mikroskop Olympus BX60 (Olympus, Japonsko)
- Ligh Cyclor Nano (Rosche, Německo)
- XP cyclor (BIOER technology, Čína)
- Flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko)
- Vortex (IKA, Německo)
- Termoblok Mixing BlockMB-102 (BIORER technology, Čína)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)
- Analytické předvážky AE 240 (Mettler Toledo, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Třecí miska s tloučkem
- Petriho misky
- Růstová komora (PSI - Photon Systém Instruments)
- Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)

4.3 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

- Agarose Molecular Grade (Bioline, kat. č. BIO-41026)
- Agar (Sigma-Aldrich, kat. č. A1296)
- Sacharóza (Duchefa, kat. č. S0809)
- Ethanol (VWR Chemicals, kat. č. 20905.320)
- 2, 5 % chloramin B (Bochemie, Česká republika)
- HyperLadder™ 50 bp (Bioline, kat. č. BIO-33054)
- 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega, kat. č. M7911)
- SimplySafe™ (EURx, kat. č. E4600-01)
- Gamborg B5 medium včetně vitamínů (B5 medium, Duchefa, Nizozemsko)
- 6-benzylaminopurin (BAP, Sigma Aldrich, USA)
- Primery (Invitrogen a Generi Biotech, Česká republika)

4.4 SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ A RŮSTOVÝCH MÉDIÍ

Tabulka č. 1: Seznam použitých roztoků a růstových médií.

Roztok	Složení	Množství na 1l
5x TBE	H ₃ BO ₃	27,5 g
	Tris-HCl	54 g
	0,5M EDTA, pH 8	20 ml
	filtrováno	
Růstové médium	Gamborg B5 médium	
	(včetně vitamínů) – viz	3 g
	tabulka č. 1	
	sacharóza	85,5 g
	agar	8 g
	kyselina 2,4- dichlorfenoxycetová (2,4- D)	0,22 mg
6-benzylaminopurin (BAP)	0,44 mg	
	pH 5,8	
	Autoklávováno	

Tabulka č. 2: Složení Gamborg B5 média, převzato z Gamborg et al. 1968.

Složky	mg·l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
H ₃ BO ₃	3
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	113,24
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
MgSO ₄	122,09
MnSO ₄ · H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
KI	0,75
KNO ₃	2500
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	150
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2
i-inositol	100
niacin	1
pyridoxin · HCl	1
thyamin · HCl	10
sacharóza	30 000
pH = 5,8	

4.5 SEZNAM POUŽITÝCH KOMERČNÍCH KITŮ

- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (BIOLINE, kat. č. BIO-65053)
- SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (BIOLINE, kat. č. BIO-98005)
- Spectrum™ Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich, STRN50)
- RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA)
- GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA)

4.6 IZOLACE PRAŠNÍKŮ A JEJICH KULTIVACE

Poupata *C. sativus* L. byla sbírána ve vývojovém stádiu před otevřením okvětních lístků o velikosti od 0,5 cm do 1 cm. Po změření byla poupata v injekční stříkačce propláchnuta 70% ethanolem, sterilizována 7 minut v 2,5% chloraminu a následně byla třikrát omyta sterilní vodou. Pomocí binokulární lupy a preparačních jehel byly z poupat izolovány prašníky. Malá část izolovaných prašníků byla přenesena do mikroskopických misku a ihned z nich byla vyizolována RNA, zbylá část prašníků byla přenesena na kultivační B5 médium doplněném 0,25 M sacharosou, 2,0 μ M 2,4-D a 1,0 μ M BAP v Petriho miskách. 1/3 prašníků na Petriho miskách byla umístěna do růstové komory a kultivována s režimem 16 hodin světlo/ 8 hodin tma o světelné intenzitě 32–36 μ mol/m² s teplotou 22 °C po dobu 4 dnů. Následně byla z prašníků vyizolována RNA. Zbylé prašníky na Petriho miskách byly ihned po izolaci umístěny do lednice při teplotě 6 °C po dobu 4 dnů. Po uplynutí kultivační doby v lednici, byla polovina Petriho misek s prašníky použita k izolaci RNA, druhá polovina misek byla přenesena do růstové komory. Po 3 dnech kultivace v růstové komoře byla provedena izolace RNA ze zbylých prašníků.

4.7 PŘÍPRAVA MIKROSKOPICKÝCH PREPARÁTŮ

Pro přípravu mikroskopických preparátů byly použity prašníky ihned po izolaci a prašníky po 4 dnech kultivace v lednici. Prašníky s pylovými zrny byly na mikroskopickém sklíčku roztlačeny a obarveny pomocí Alexandrova barvení za užití metodiky dle Peterson et al. (2010). Alexandrův roztok obsahuje 10 ml 95% etanolu, 10 ml malachitonové zeleně (1 ml 1% roztoku v 95% etanolu), 50 ml destilované vody, 25 ml glycerolu, 5 g fenolu, 5 ml 1% chloralhydrátu v destilované vodě, 50 ml fuchsinu (5 ml 1% roztoku ve vodě), 5 ml orange G (0,5 ml 1% roztoku ve vodě), 1-4 ml kyseliny octové. Pro jasnější zobrazení jader byla obarvená pylová zrna zakápnuta fluorescenčním barvivem DAPI. Hotové preparáty byly pozorovány při zvětšení 400x pod UV světlem mikroskopem Olympus BX60 a vyfoceny pomocí programu Quick Camera.

4.8 IZOLACE RNA

Izolace byla provedena pomocí SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma) podle návodu výrobce. Homogenizace prašníků *C. sativus* L proběhla roztřením v třecích miskách s tekutým dusíkem. K roztřenému materiálu bylo přidáno 500 μ l lyzačního pufru a 5 μ l 2-merkaptoethanolu. Takto připravená směs byla v mikroskopických miskách řádně protřepána

a následně 5 minut inkubována v termobloku při 56 °C. Další kroky byly provedeny podle protokolu A výrobce včetně ošetření DNasou z komerčního kitu RQ1 RNase-free DNase firmy Promega. Veškeré centrifugace byly provedeny při 13 000 rpm a 4 °C. Izolovaná RNA byla eluována pomocí 50 µl elučního roztoku. Koncentrace vyizolované RNA z *C. sativus* L. byla změřena pomocí přístroje NanoDrop™ 2000 a její kvalita byla vyhodnocena pomocí elektroforetické separace. Vyizolovaná RNA z čerstvých prašníků, z prašníků kultivovaných 4 dny na médiu ve fytotronu, dále prašníků kultivovaných 4 dny na médiu v lednici a z prašníků kultivovaných 4 dny v lednici a následně 4 dny ve fytotronu byla uchována při teplotě -80 °C.

4.9 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE

Kvalita vyizolované RNA byla ověřena elektroforetickou separací v 1% agarozovém gelu v 0,5x TBE. Pro zviditelnění separovaných produktů byly do gelu přidány 2 µl barviva EurX SimplySafe™. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder™ 50 bp a jako nanášecí pufr byl použit 5X Green GoTaq Reaction Buffer. Elektroforéza probíhala při stejnosměrném napětí 100 V po dobu 30 min. Poté byl gel přenesen do UV Transluminátoru a snímán pod UV světlem.

4.10 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Pro reverzní transkripci vyizolované RNA *Cucumis sativus* L, jejíž koncentrace byla změřena na přístroji NanoDrop™ 2000 a sjednocena (ředěním) na 50 ng/µl, byl použit kit SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (BIOLINE) a anchored-oligo (dT)18 primery. Nejprve byl připraven mix o celkovém objemu 40 µl. Obsahoval 30 µl vyizolované RNA, 8 µl reakčního pufru a 2 µl reverzní transkriptázy. Reverzní transkripce byla provedena v XP cycleru (BIORER) s nastavením inkubace mixu 10 minut při teplotě 25 °C pro nasedání primerů, 15 minut při teplotě 42 °C pro reverzní transkripci a 5 minut při teplotě 85 °C pro inaktivaci reverzní transkriptázy.

Tabulka č. 3: Reakční podmínky reverzní transkripce.

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
Primer annealing	25	10
Reverse transkription	42	15
Inactivation	85	5
Chill	4	-

4.11 PCR REAKCE

Pro ověření přítomnosti transkriptů, nasedání primerů a optimalizaci reakce bylo provedeno několik PCR reakcí na vzorcích cDNA z *C. sativus* L. Použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 4. PCR reakce byla provedena za použití kitu GoTaq® DNA Polymerase firmy Promega dle návodu výrobce v XP cycleru (BIOER). Reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 4. Produkty PCR reakce byly vizualizovány elektroforetickou separací.

Tabulka č. 4: Časový a teplotní profil PCR reakce.

Krok	Teplota (°C)	Čas (sec)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	120	1
Denaturace	95 °C	30	
Annealing	57 °C	30	45
Elongace	72 °C	30	
Finální extenze	95 °C	300	1

4.12 POUŽITÉ PRIMERY A JEJICH NAVRŽENÍ

Použité primery dostupné na pracovišti (syntetizovány a dodány firmami Invitrogen a Generi-Biotech) byly nejprve testovány, zda budou nasedat na cDNA *C. sativus* L. a pomocí gradientové PCR byla vybrána vhodná annealingová teplota (57 °C). Sekvence testovaných primerů jsou použity z diplomových prací Flídr (2013), Cápál (2012) a Crlíková (2011). Jejich seznam a sekvence jsou zaznamenány v tabulce č. 5. Jako referenční gen pro *C. sativus* L. byl použit gen pro Aktin.

Tabulka č. 5: Primery amplifikující oblasti sledovaných genů.

Sledovaný gen	Primer	Sekvence	Velikost produktu (bp)
Aktin	F	5'-TGCTGGTCGTGACCTTACTG-3'	226
	R	5'-GAATCTCTCAGCTCCGATGG-3'	
APX	F	5'-CTCTGGTGGTCACACATTGG-3'	209
	R	5'-CCTCATCGGCAGCATATTTT-3'	

GPX	F	5'-CAGCGCTTACAAAGCAAAGG-3'	198
	R	5'-GTGCAAGCAAAGCTGCACAAT-3'	
CAT	F	5'-TTGACGATATTGGCATCC-3'	153
	R	5'-TAGCATCTTCCTCCAGCA-3'	
PCNA	F	5'-GGTTCTCTCCTCAAGAAGGT-3'	214
	R	5'-TGATATCATCGTTACCAGCA-3'	
XTH	F	5'-CAACAAGAGGAGGGCTGG-3'	681
	R	5'-AGAGATTCTTTCATGCACTAT-3'	
LOXCs1	F	5'-TTGGCTAAGGCTTTTGTCCGG-3'	182
	R	5'-GTGGCAATCACAAACGGTTC-3'	
LOXCs2	F	5'-TTTGCTCGCCAGACACTTG-3'	437
	R	5'-GGGATCACCATAAACGGCC-3'	

4.13 REAL-TIME PCR

Real-time PCR byla provedena pomocí přístroje LightCycler Nano (Roche). Reakční směs byla namíchána za použití kitu SensiFAST™ SYBR® No-ROX (BIOLINE) o celkovém objemu 20 µl podle návodu výrobce. Přesné složení SYBR mixu je popsáno v tabulce č. 6. Množství dodané cDNA do reakce bylo 110 ng. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs obsahující reakční složky bez DNA (místo ní bylo pipetováno 2,1 µl H₂O). Reakční podmínky jsou popsány v tabulce č. 7.

Tabulka č. 6: Složení RT-PCR mixu pro 1 vzorek.

Složky RT-PCR mixu	Objem [µl]
SYBR mix	10
F primer (10 µmol/l)	0,8
R primer (10 µmol/l)	0,8
cDNA	2,1
deionizovaná voda	6,3

Tabulka č. 7: Časový a teplotní profil real-time PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (sec)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	600	1
Denaturace	95 °C	10	45
Annealing	57 °C	30	
Elongace	72 °C	20	
Finální extenze	95 °C	10	1
Analýza teploty tání	60 °C → 90 °C	60	1

Pro vyhodnocení dat byl použit program Light Cycler Nano Software 1.1., který provedl kvantitativní analýzu vzorků a automaticky určil Ct hodnoty pro jednotlivé vzorky. Hodnoty byly dále zpracovány metodou $\Delta\Delta C_T$. Jako referenční gen (tzv. housekeeping gen) k relativní kvantifikaci byl zvolen gen pro Aktin. Jako kontrola posloužily hodnoty exprese kontrolních vzorků, které nebyly kultivovány na médiu.

Výpočet relativní exprese metodou $\Delta\Delta C_T$:

$$\text{Relativní exprese} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ vzorek}} - \Delta C_{T \text{ kontrola}}$$

$$\Delta C_T = C_{T \text{ studovaný gen}} - \Delta C_{T \text{ referenční gen}}$$

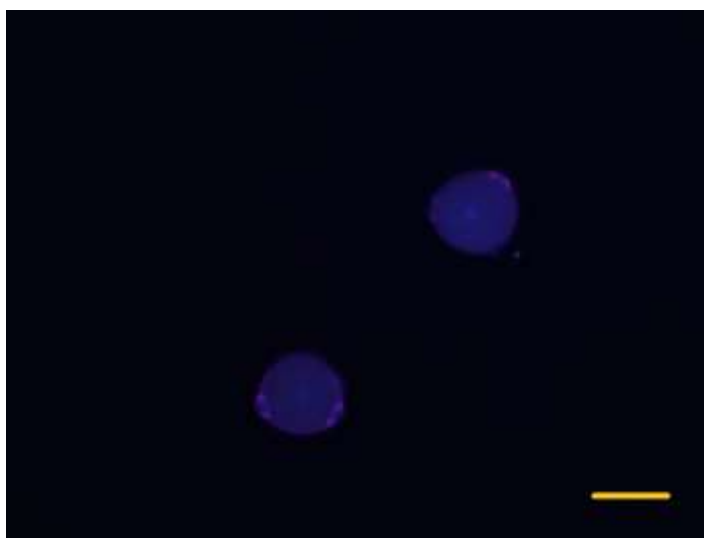
5 VÝSLEDKY

5.1 VÝSLEDKY STUDIÍ ANDROGENNÍHO VÝVOJE

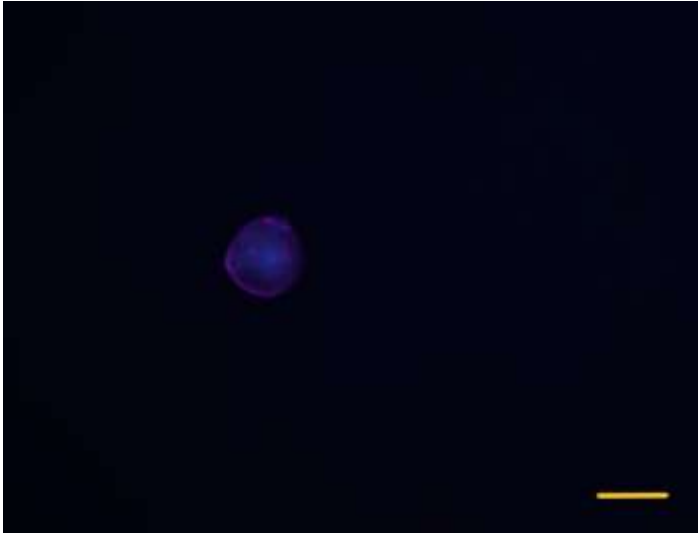
Pro studium androgeneze byla sbírána poupata *C. sativus* L. o velikosti od 0,5 do 1 cm (viz obrázek č. 2), kdy prašníky (3–5 mm) obsahovaly mikrospory ve středním až pozdním jednojaderném stádiu, což bylo determinováno mikroskopicky pomocí Alexandrova barvení a DAPI. Mikrospory ihned po izolaci byly kulovitých útvarů s jedním jádrem (viz obrázek č. 3). Po 96 hodinách *in vitro* kultivace prašníků na B5 médiu v chladu, byla potvrzena přítomnost vícejaderných mikrospor (viz obrázek č. 4).



Obrázek č. 2: Velikost poupat *C. sativus* L. před izolací prašníků



Obrázek č. 3: Jednojaderné mikrospory *C. sativus* L. ihned po izolaci. Měřítka 30 μm .



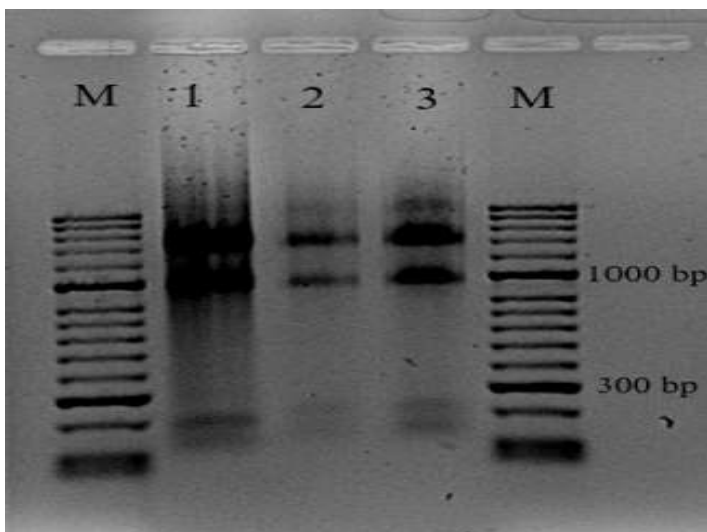
Obrázek č. 1: Dvoujaderné mikrospory *C. sativus* L. po 96 hodinách kultivace v chladu.
Měřítko 30 μm

5.2 ANALÝZA EXPRESE GENŮ

Do výzkumu molekulárních aspektů androgeneze byly použity čerstvě vyizolované prašníky a prašníky *in vitro* kultivované na médiu za různých podmínek:

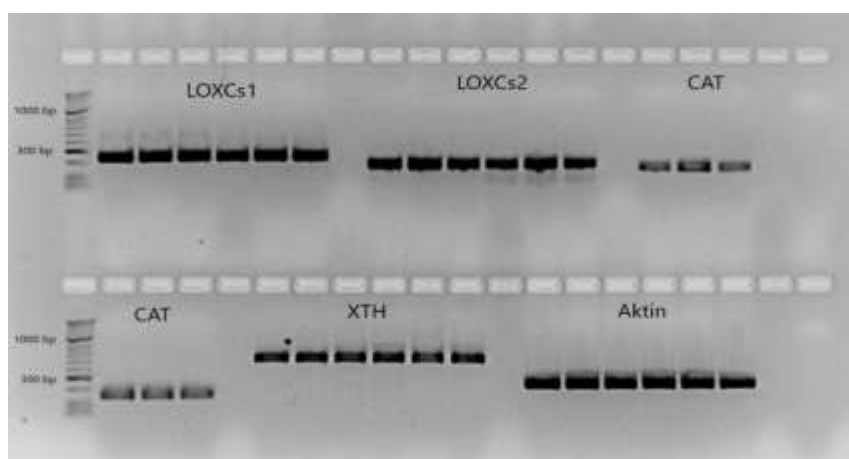
- Prašníky ihned po izolaci (kontrola)
- Prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu (I)
- Prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu (II)
- Prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu (III)

Nejprve byla z prašníku izolována RNA, jejíž kvalita byla ověřena elektroforetickou separací (viz obrázek č. 5).

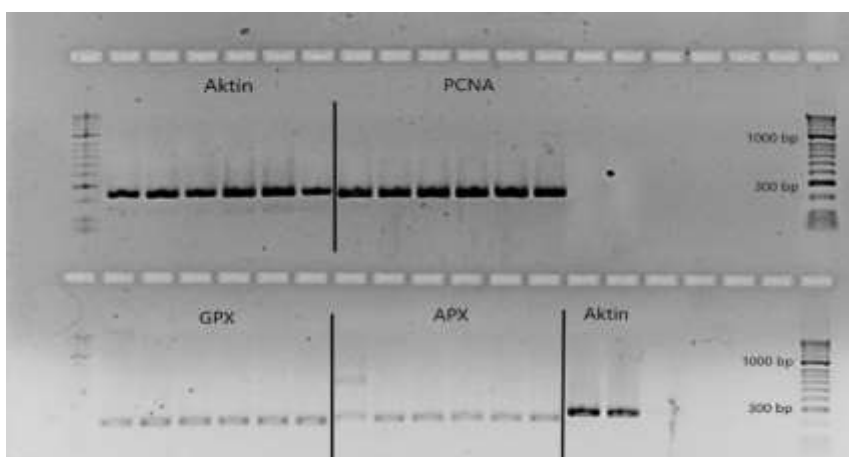


Obrázek č. 5: Elektroforetická separace vyizolované RNA z prašníků., M – marker molekulové hmotnosti HyperLadder™ 50 bp, 1 – RNA z prašníků ihned po izolaci, 2 – RNA z prašníků po 96 hodinách od izolace s chladovým působením, 3 – RNA z prašníků po 168 hodinách od izolace s chladovým působením

Vyizolovaná RNA byla následně reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Přítomnost transkriptů a nasedání primerů (viz tabulka č. 4) bylo ověřeno PCR reakcí a následnou identifikací PCR produktů pomocí elektroforetické separace. Všechny primery byly funkční, jelikož byly identifikovány produkty PCR reakcí všech primerů na elektroforeogramu (viz obrázek č. 6 a 7). Všechny použité primery nasedaly na DNA specificky a velikosti produktů odpovídají předpokládaným délkám sekvencí.



Obrázek č. 6: Elektroforetická separace produktů PCR reakce s první sadou primerů pro studované geny. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder™ 50 bp.



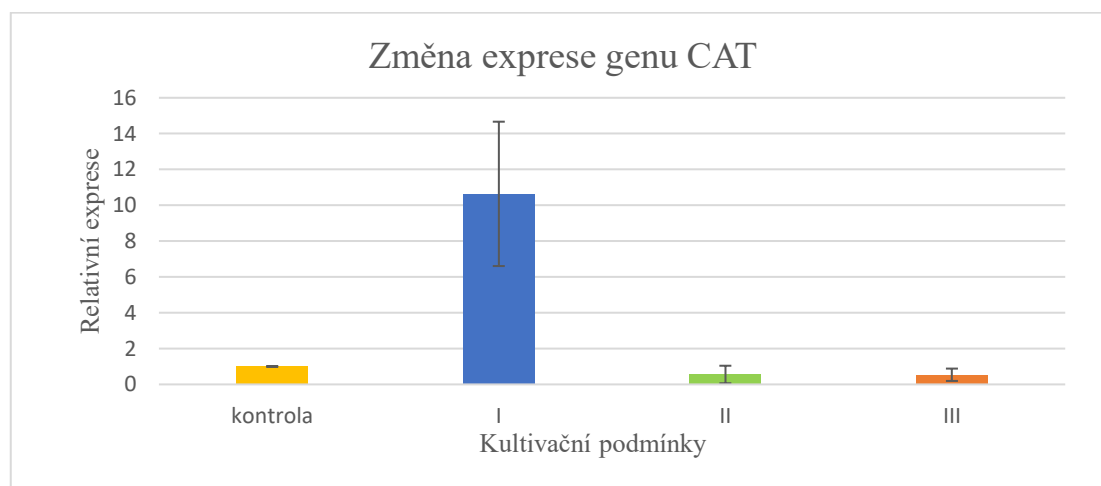
Obrázek č. 7: Elektroforetická separace produktů PCR reakce s druhou sadou primerů pro studované geny. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder™ 50 bp.

Vzorky cDNA ze všech fází dále posloužily ke studiu vzorců exprese některých diferencovaně exprimovaných genů během indukce androgenese metodou RT-PCR. Bylo vybráno celkem sedm genů zapojených jak do odpovědi na stresové ošetření, a to gen pro askorbát peroxidázu (APX), katalázu (CAT), glutathion peroxidázu (GPX) a lipoxygenázy (LOXC1, LOXC2) tak do modifikací buněčné stěny gen pro xyloglukan endotransglukosylázu/hydrolázu (XTH) a také do proliferačních procesů gen pro protein buněčného jaderného antigenu (PCNA). Jako referenční gen byl použit Aktin. Byla porovnávána exprese genů u vzorků prašníků kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II a III) se vzorky prašníků ihned po izolaci (kontrola).

5.2.1 Exprese genů zapojených do buněčné odpovědi na stres

Exprese genu CAT

Exprese genu CAT měla po ošetření chladem sestupnou tendenci. V porovnání s prašníky bez kultivace, klesla po 96 hodinách téměř o polovinu na hodnotu 0,5x. Po 168 hodinách se snížila již jen nepatrně (viz kultivační podmínky II a III, graf č. 1). Oproti tomu v prašnicích neošetřených chladem po 96 hodinách exprese vzrostla 10,6x (viz kultivační podmínky I, graf č. 1).

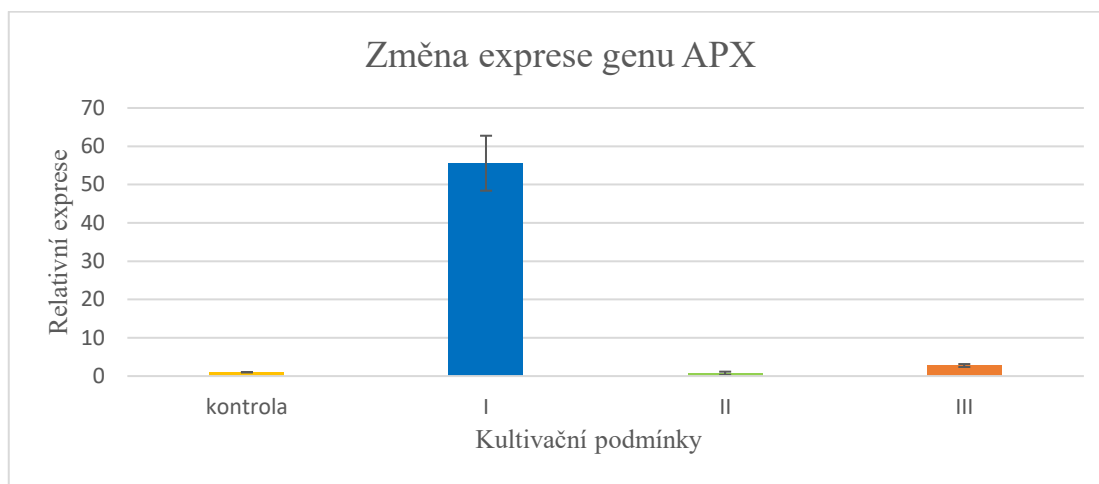


Graf č. 1: Relativní exprese genu CAT v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašníku.¹ Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

¹ I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu.

Expresse genu APX

U exprese genu APX lze sledovat v prašnicích ošetřených chladem nejprve sestupný a následně vzestupný charakter. V porovnání s prašníky bez kultivace exprese po 96 hodinách klesla na hodnotu 0,7x. Po 168 hodinách se naopak exprese zvýšila až 2,7x oproti kontrole (viz kultivační podmínky II, III graf č. 2). V prašnicích kultivovaných bez působení chladu byla exprese po 96 hodinách oproti kontrole 55,5x vyšší (viz kultivační podmínky I, graf č. 2).

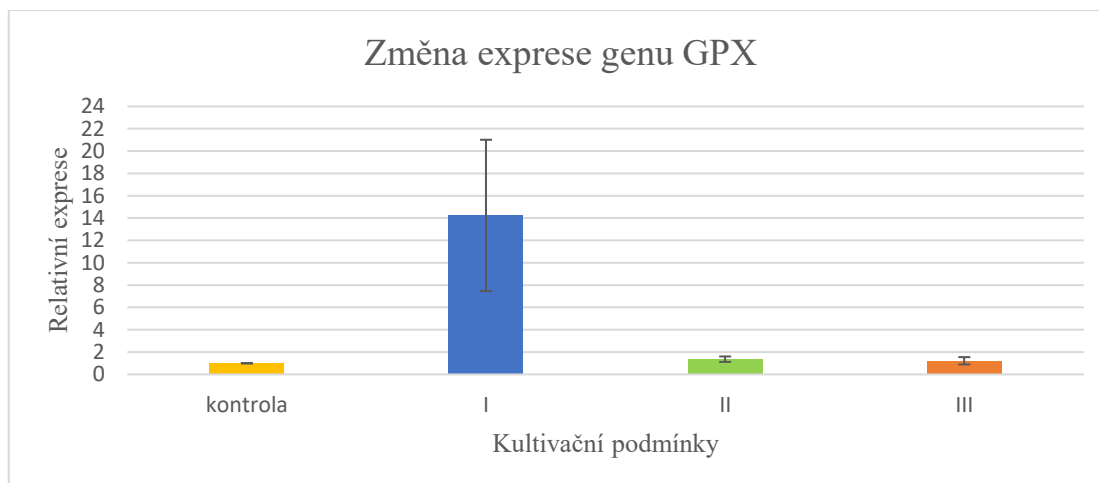


Graf č. 2: Relativní exprese genu APX v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašníku.² Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

Expresse genu GPX

Expresse genu GPX měla oproti genu APX v prašnicích ošetřených chladem nejdříve vzestupnou a následně sestupnou tendenci. V porovnání s prašníky bez kultivace byla po 96 hodinách exprese 1,4x vyšší. Po 168 hodinách mírně klesla a oproti kontrole byla vyšší 1,2x (viz kultivační podmínky II, III, graf č. 3). Naopak u prašníků kultivovaných bez chladového ošetření se exprese oproti kontrole zvýšila 14,2x (viz kultivační podmínky I, graf č. 3).

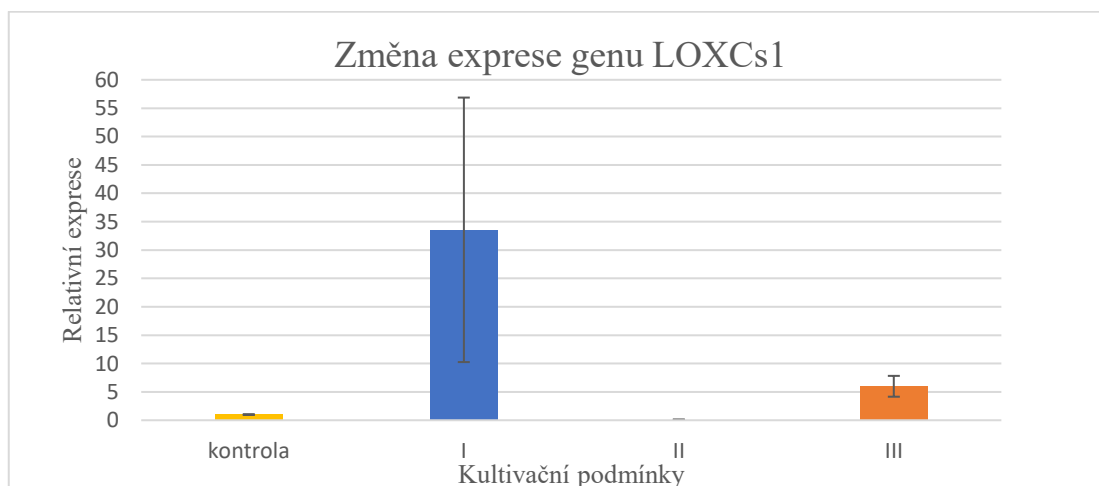
² I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu



Graf č. 3: Relativní exprese genu GPX v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašniku.³ Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

Expresce genu LOXC1

Expresce LOXC1 v prašnicích ošetřených chladem má podobnou snižující se a následně zvyšující tendenci jako gen APX. V porovnání s prašníky bez kultivace klesla exprese po 96 hodinách téměř 100x a po 168 hodinách byla oproti kontrole 6x vyšší (viz kultivační podmínky II, III, graf č. 4). U prašníků kultivovaných bez působení chladu byla exprese po 96 hodinách vyšší 33,5x oproti kontrole (viz kultivační podmínky I, graf č. 4).



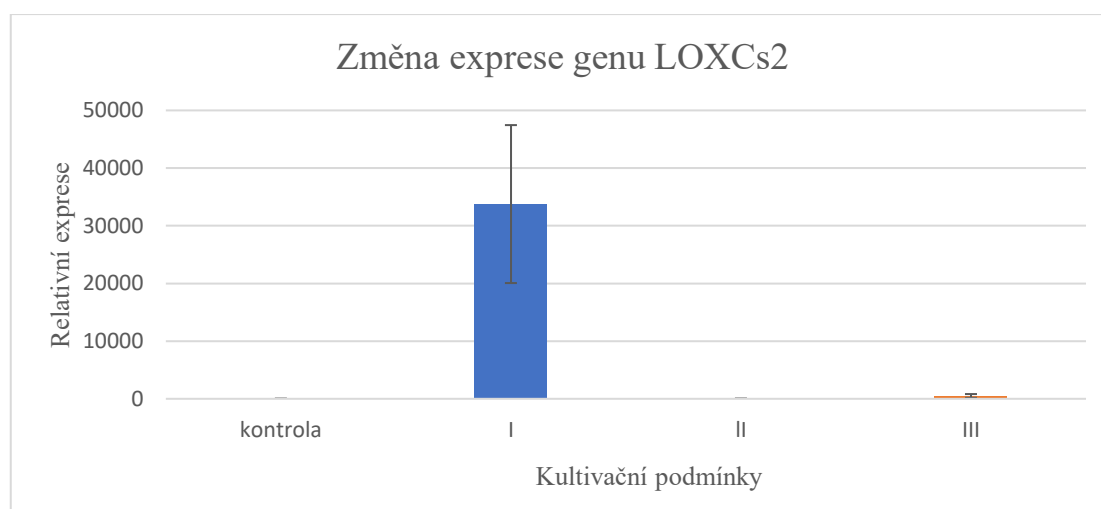
³ I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu.

Graf č. 4: Relativní exprese genu LOXC1 v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašníku.⁴

Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

Expresa genu LOXC2

Největší změnu exprese ze všech zkoumaných genů lze pozorovat u genu LOXC2. U prašníků ošetřených chladem v porovnání s prašníky bez kultivace lze pozorovat 6x vyšší expresi již po 96 hodinách. Po 168 hodinách byla exprese oproti kontrole vyšší 500x (viz kultivační podmínky II, III, graf č. 5). V prašnicích kultivovaných bez ošetření chladem se exprese dostala na hodnotu 33 700x (viz kultivační podmínky I, graf č. 5).



Graf č. 5: Relativní exprese genu LOXC2 v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašníku. Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

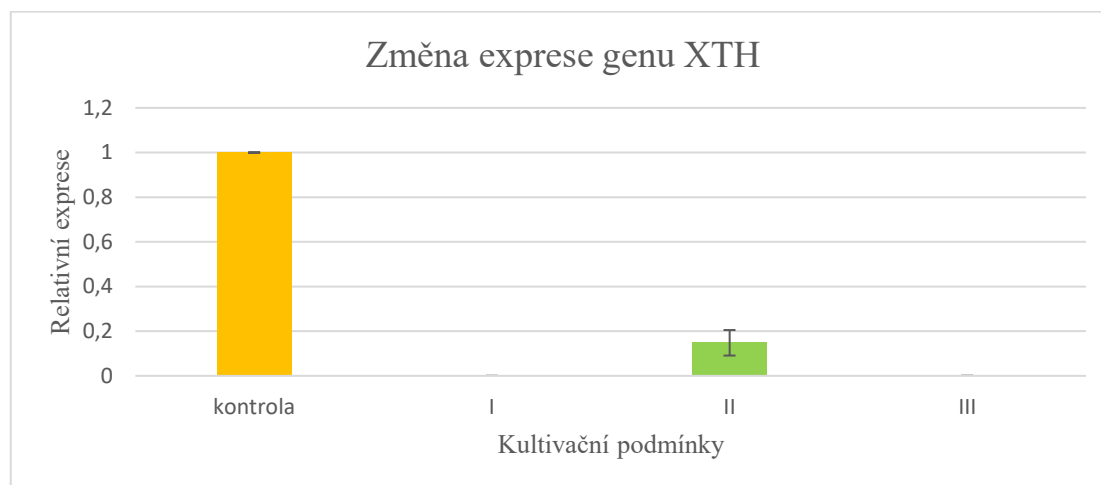
5.2.2 Expresa genů zapojených do proliferačních procesů a modifikací buněčné stěny

Expresa genu XTH

U exprese genu XTH pozorujeme ze všech genů největší snížení exprese oproti kontrole. V porovnání s prašníky bez kultivace se exprese v prašnicích ošetřených chladem po 96 hodinách snížila na hodnotu 0,15x. Po 168 hodinách se gen XTH neexprimoval vůbec (viz kultivační podmínky II, III, graf č. 6). V prašnicích kultivovaných bez působení

⁴ I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu.

chladu nebyla zaznamenána téměř žádná exprese genu XTH (viz kultivační podmínky I, graf č. 6).

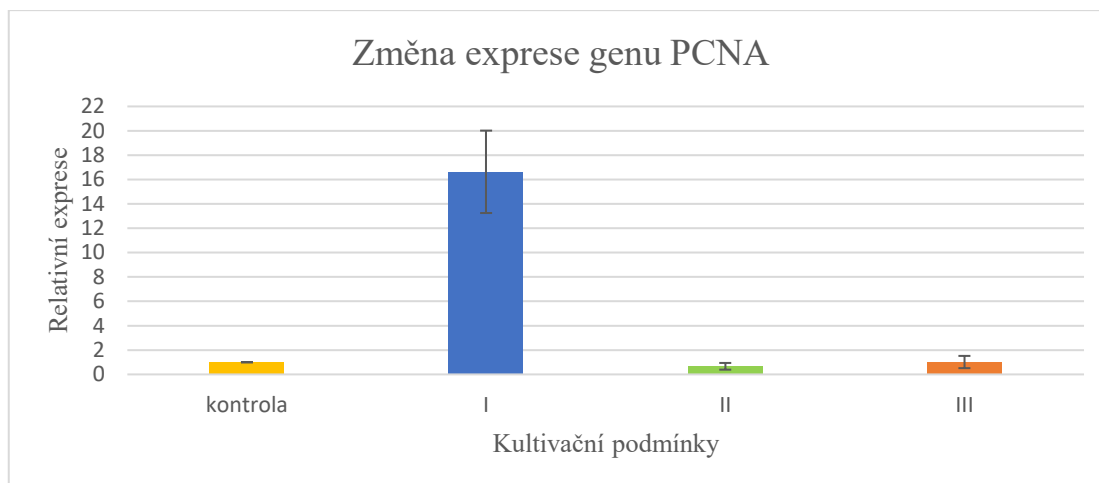


Graf č. 6: Relativní exprese genu XTH v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašniku.⁵ Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

Expresa genu PCNA

U exprese genu PCNA lze pozorovat u prašníků ošetřených chladem nejprve snížení a následně zvýšení exprese. V porovnání s expresí prašníků bez kultivace se po 96 hodinách snížila exprese oproti kontrole na hodnotu 0,7x. Po 168 hodinách se exprese opět zvýšila a dosáhla hodnotu kontroly (viz kultivační podmínky II, III, graf č. 7). U prašníků kultivovaných bez působení chladu stoupla exprese oproti kontrole po 96 hodinách 16,6x (viz kultivační podmínky I, graf č. 7).

⁵ I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu.



Graf č. 7: Relativní exprese genu PCNA v prašnicích *C. sativus* L. kultivovaných *in vitro* za různých podmínek (I, II, III) porovnaná s expresí v čerstvém prašníku.⁶

Hodnota exprese v kontrole je vždy rovna 1.

⁶ I – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované bez působení chladu, II – prašníky 96 hodin po izolaci, kultivované v chladu, III – prašníky 168 hodin po izolaci, kultivované 96 hodin v chladu a dále 72 hodin bez působení chladu

6 DISKUZE

Přechod mikrospor z gametofytické dráhy na sporofytickou lze vyvolat působením různých stresových faktorů – fyzikálních a chemických, často specifických pro každý druh. Teplotní stres je považován za nejúčinnější ošetření k vyvolání mikrosporového embryogenního vývoje (Popova et al. 2016). Tato práce byla zahájena izolací prašníků *C. sativus* L. a jejich následnou kultivací *in vitro* na médiu B5 dle úspěšného protokolu pro indukci androgeneze od Ashok Kumar *et al.*, (2003) za různých teplotních podmínek. Chladové ošetření (4 °C) bylo aplikováno přímo na prašníky v kultivačním médiu. Cílem bylo vyvolat mikrosporovou embryogenezi a snížit degradaci mikrospor. Úspěšné založení kultury prašníků bylo prokázáno světelným mikroskopem. Pozorováním preparátů mikrospor po 4 dnech kultivace v chladu obarvených DAPI byla potvrzena přítomnost vícejaderných stádií. Počáteční symetrické dělení je jeden z markerů indukce embryogeneze v mikrosporových kulturách (Soriano *et al.*, 2013).

Z molekulárního hlediska je zisk embryogenního potenciálu charakterizován rozsáhlou remodelací genové exprese s upregulací genů zapojených do primárního metabolismu a biosyntézy lipidů, sacharidů a bílkovin (Germanà 2011). Další část této práce byla zaměřena na analýzu rozdílně exprimovaných genů z hlediska buněčné odpovědi na stres a proliferačních procesů spojených s embryogenezí. Navzdory četným zprávám popisujícím stimulaci androgeneze nízkou teplotou však neexistují žádná data, která by ukazovala, že indukce androgeneze je přímým následkem ošetření chladem. Naopak samotná nízká teplota aplikovaná na izolované mikrospory pšenice, tabáku a pepře nestačila ke změně způsobu jejího vývoje. Výsledky Žur *et al.*, (2008) potvrzují hypotézu, že chladová předúprava během přeprogramování mikrospor působí spíše jako antistresový faktor zmírňující následky způsobené nedostatkem živin. Aby byl vyhodnocen účinek chladového ošetření, byla do této práce zahrnuta analýza exprese genů u prašníků *in vitro* kultivovaných na médiu bez chladového ošetření.

Pro kultury *in vitro* je typická akumulace reaktivních kyslíkatých sloučenin, které ve větším množství představují pro buňku oxidativní stres. Mezi enzymy zachycující ROS patří například CAT, APX a GPX. Exprese CAT v prašnicích po chladovém ošetření byla nižší a postupně klesala než v čerstvých prašnicích. Tyto výsledky se shodují se studií Shim *et al.*, (2003) ve které naznačují, že pokles aktivity CAT je jev vyskytující se u mnoha druhů rostlin pod oxidativním stresem a souvisí s akumulací kyseliny salicylové

v oxidativně stresovaných rostlinách. Oproti tomu exprese genu APX v prašnicích po chladovém ošetření sice mírně klesla, ale po 168 hodinách byla exprese téměř třikrát vyšší než v čerstvých prašnicích. V mnoha studiích bylo prokázáno, že stresové faktory jako například chlad nebo hromadění H₂O₂ mohou zvýšit expresi genů APX a GPX buď k potlačení nebo eliminaci stresorů. Navíc bylo dokázáno, že profily exprese GPX jsou vysoce spojeny s metabolickým stavem buněk (Ozyigit *et al.*, 2016). Exprese genu GPX v reakci na chlad vzrostla, avšak po 168 hodinách kultivace začala mírně klesat. V porovnání s prašníky kultivovanými bez chladového ošetření, byla exprese CAT, APX i GPX v prašnicích ošetřených chladem podstatně nižší, což může značit, že v prašnicích po 96 hodinách kultivace bez chladového ošetření docházelo k vyšší akumulaci ROS a tím vyšší aktivitě enzymů.

Rostlinné lipoxygenázy (LOX) se podílí na obranných reakcích prostřednictvím iniciace lipolytické kaskády při degradaci membrány například během stárnutí a teplotních šoků. V této práci byl odhalena rozdílná exprese dvou genů LOX, což naznačuje jejich rozmanité funkce v abiotickém stresu. Exprese genu LOXC1 v prašnicích ošetřených chladem nejprve klesla a po 168 hodinách kultivace se zvýšila oproti čerstvým prašníkům 6krát. Transkripty genu LOXC2 měly již po 96 hodinách vzestupnou tendenci a po 168 hodinách dosáhly maxima (500x). Je známo, že chladové ošetření může způsobovat katabolické reakce na buněčných membránách. Možnost, že peroxidace lipidů katalyzovaná LOX hraje roli v reakci na chlad, již byla zkoumána Mao *et al.*, (2007) měřením aktivity LOX v plodu okurky při nízké teplotě. Zjistili, že působení chladu bylo doprovázeno zvýšením aktivity LOX. Exprese genů LOXC1 a LOXC2 v prašnicích ošetřených chladem v porovnání s prašníky kultivovanými bez chladového ošetření je však mnohem nižší. Tyto výsledky mohou naznačovat vyšší míru poranění a destrukce buněčných membrán buněk prašníků bez chladového ošetření.

Mezi geny zapojené do modifikací buněčné stěny patří například XTH. Xyloglukan je hlavní polysacharid v primárních buněčných stěnách a předpokládá se, že xyloglukanové endotransglukosylázy / hydrolázy (XTH) se účastní sestavování rostlinných buněčných stěn. V této práci bylo zjištěno, že gen XTH se v kultivovaných prašnicích téměř neexprimoval. Výsledky jsou v souladu se studií Nakamura *et al.*, (2003), kde navzdory intenzivnímu dělení buněk a růstu pozorovanému v kultuře okurek se transkripty XTH v počátečních fázích vývoje embrya nehromadily. Zdá se tedy, že exprese XTH je regulována vývojovými faktory (Malinowski *et al.*, 2004). Exprese genů PCNA ve všech

organismech koreluje s buněčnou proliferací, a tedy se syntézou DNA během replikace genomu v S fázi buněčného cyklu (Strzalka a Ziemienowicz 2011). Expresní profil genu PCNA v prašnicích ošetřených chladem má nejprve mírně klesající charakter, avšak po 168 hodinách kultivace je exprese rovna čerstvým prašníkům. Jelikož je buněčná proliferace doprovázena replikací DNA, opětovné zvýšení exprese genu PCNA po 168 hodinách kultivace může být způsobeno obnovením replikace DNA spojené s mikrosporovou embryogenezí. V porovnání s prašníky kultivovanými bez chladového ošetření byla exprese genu PCNA v prašnicích ošetřených chladem výrazně nižší. Z toho vyplývá, že chlad v prašnicích snižuje replikaci DNA.

V této práci bylo zjištěno, že indukce androgeneze má vliv na změnu exprese genů. Z výsledků plyne pozitivní účinek nízké teploty, pravděpodobně založený na zpomalení degradačních procesů membrán a ochran mikrospor před akumulací ROS. Pro bližší pochopení molekulárních mechanismů androgeneze je nutná podrobnější analýza klíčových genů stimulujících indukci změny vývojové dráhy mikrospor.

7 ZÁVĚR

Úspěšná androgenese závisí na řadě faktorů, jako je genotyp rostliny, stupeň vývoje pylu, kultivační médium a zejména stresová stimulace. V této práci byla provedena indukce androgenese chladem v *in vitro* kulturách prašníků *C. sativus* L.

Hlavní částí práce bylo získání přehledu ve změně profilů genové exprese během stresem vyvolaného přeprogramování mikrospor z pylu směrem k androgennímu vývoji. Byla zároveň provedena analýza exprese genů v čerstvých prašnicích a prašnicích *in vitro* kultivovaných bez působení chladu. Byla zaznamenána změna transkripce genů zapojených do odbourávání ROS, jako jsou CAT, APX a GPX v prašnicích ošetřených chladem. Exprese genu PCNA, který se podílí na proliferačních procesech nebyla chladem výrazně ovlivněna a gen XTH spojený s modifikací buněčné stěny se neexprimoval téměř vůbec. Znatelný nárůst exprese i přes vystavení chladu byl zaznamenán u genů LOXC1 a LOXC2, které jsou zapojeny do ochrany buněčných membrán. Exprese všech zkoumaných genů byla v prašnicích neošetřených chladem výrazně vyšší než v prašnicích vystavených chladu. Z toho plynou pozitivní účinky nízké teploty v ochraně buňky před degeneračními procesy, zpomalení buněčných procesů a tím možné nastartování embryogeneze. Pro pochopení molekulárních mechanismů androgenese je nutné se dále zaměřit spíše na geny definitivně spojené s cestou mikrosporové embryogeneze.

8 LITERATURA

- Ashok Kumar, H. G., H. N. Murthy, a K. Y. Paek. 2003. „Embryogenesis and Plant Regeneration from Anther Cultures of *Cucumis Sativus* L." *Scientia Horticulturae* 98 (3): 213–22. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00003-7).
- Budar, F., a G. Pelletier. 2001. „Male Sterility in Plants: Occurrence, Determinism, Significance and Use". *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie* 324 (6): 543–50. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(01\)01324-5](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(01)01324-5).
- Cápal. 2012. „Epigenetické aspekty protoplastových kultur". Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Caverzan, Andréia, Gisele Passaia, Silvia Barcellos Rosa, Carolina Werner Ribeiro, Fernanda Lazzarotto, a Márcia Margis-Pinheiro. 2012. „Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection". *Genetics and Molecular Biology* 35 (4 Suppl): 1011–19.
- Crlíková. 2011. „Cytogenetický a expresní profil protoplastových kultur vzhledem k jejich regeneraci." Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Dong, Yan-Qi, Wei-Xing Zhao, Xiao-Hui Li, Xi-Cun Liu, Ning-Ning Gao, Jin-Hua Huang, Wen-Ying Wang, Xiao-Li Xu, a Zhen-Hai Tang. 2016. „Androgenesis, Gynogenesis, and Parthenogenesis Haploids in Cucurbit Species". *Plant Cell Reports* 35 (10): 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>.
- Dunwell, Jim M. 2010. „Haploids in Flowering Plants: Origins and Exploitation". *Plant Biotechnology Journal* 8 (4): 377–424. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x>.
- Feussner, Ivo, Hartmut Kühn, a Claus Wasternack. 2001. „Lipoxygenase-Dependent Degradation of Storage Lipids". *Trends in Plant Science* 6 (6): 268–73. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01950-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01950-1).
- Flídr. 2013. „Expresní profil protoplastových kultur". Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

- Fu, Jian-Yu. 2014. „Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses". *Botanical Studies* 55 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-7>.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, a K. Ojima. 1968. „Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells". *Experimental Cell Research* 50 (1): 151–58. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).
- Germanà, Maria Antonietta. 2011. „Anther Culture for Haploid and Doubled Haploid Production". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104 (3): 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>.
- Hu, Lifang, Yingui Yang, Lunwei Jiang, a Shiqiang Liu. 2016. „The catalase gene family in cucumber: genome-wide identification and organization". *Genetics and Molecular Biology* 39 (3): 408–15. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0192>.
- Huang, Sanwen, Ruiqiang Li, Zhonghua Zhang, Li Li, Xingfang Gu, Wei Fan, William J. Lucas, et al. 2009. „The Genome of the Cucumber, *Cucumis Sativus* L." *Nature Genetics* 41 (12): 1275–81. <https://doi.org/10.1038/ng.475>.
- Chen, Mingyang, Kun Li, Haipeng Li, Chun-Peng Song, a Yuchen Miao. 2017. „The Glutathione Peroxidase Gene Family in *Gossypium Hirsutum*: Genome-Wide Identification, Classification, Gene Expression and Functional Analysis". *Scientific Reports* 7 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep44743>.
- Ighodaro, O. M., a O. A. Akinloye. 2018. „First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid". *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4): 287–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- Jähne, Alwine, a Horst Lörz. 1995. „Cereal Microspore Culture". *Plant Science* 109 (1): 1–12. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04149-O](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04149-O).
- Korhoňová. 2011. „Regenerační procesy v protoplastových kulturách rodu *Brassica*". Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Koundrioukoff, S., Z. O. Jónsson, S. Hasan, R. N. de Jong, P. C. van der Vliet, M. O. Hottiger, a U. Hübscher. 2000. „A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Cdk2 Targets PCNA-Interacting Proteins for Phosphorylation". *The*

Journal of Biological Chemistry 275 (30): 22882–87.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M001850200>.

Lantos, Csaba, Anikó Gémes Juhász, Pál Vági, Róbert Mihály, Zoltán Kristóf, a János Pauk. 2012. „Androgenesis Induction in Microspore Culture of Sweet Pepper (*Capsicum Annuum* L.)". *Plant Biotechnology Reports* 6 (2): 123–32.
<https://doi.org/10.1007/s11816-011-0205-0>.

Ma, Zhongxin, a Victor L. Davidson. 2017. „Ascorbate Protects the Di-Heme Enzyme, MauG, Against Self-Inflicted Oxidative Damage by an Unusual Antioxidant Mechanism". *The Biochemical journal* 474 (15): 2563–72.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20170349>.

Malinowski, Robert, Marcin Filipecki, Norikazu Tagashira, Anita Wiśniewska, Paweł Gaj, Wojciech Plader, a Stefan Malepszy. 2004. „Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes in cucumber (*Cucumis sativus*) – differential expression during somatic embryogenesis†". *Physiologia Plantarum* 120 (4): 678–85.
<https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0289.x>.

Mao, Linchun, Huaqing Pang, Guoze Wang, a Chenggang Zhu. 2007. „Phospholipase D and Lipoxygenase Activity of Cucumber Fruit in Response to Chilling Stress". *Postharvest Biology and Technology* 44 (1): 42–47.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.009>.

Maraschin, S. F., W. de Priester, H. P. Spaink, a M. Wang. 2005. „Androgenic Switch: An Example of Plant Embryogenesis from the Male Gametophyte Perspective". *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1711–26. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>.

Maraschin, Simone de F., Martien Caspers, Elena Potokina, Florian Wülfert, Andreas Graner, Herman P. Spaink, a Mei Wang. 2006. „CDNA Array Analysis of Stress-Induced Gene Expression in Barley Androgenesis". *Physiologia Plantarum* 127 (4): 535–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00673.x>.

Mhamdi, Amna, Guillaume Queval, Sejir Chaouch, Sandy Vanderauwera, Frank Van Breusegem, a Graham Noctor. 2010. „Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models". *Journal of Experimental Botany* 61 (15): 4197–4220.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>.

- Milla, Miguel A. Rodriguez, Alberto Maurer, Alicia Rodriguez Huete, a J. Perry Gustafson. 2003. „Glutathione Peroxidase Genes in Arabidopsis Are Ubiquitous and Regulated by Abiotic Stresses through Diverse Signaling Pathways". *The Plant Journal* 36 (5): 602–15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01901.x>.
- Morgado-Santos, Miguel, Sara Carona, Luís Vicente, a Maria João Collares-Pereira. 2017. „First Empirical Evidence of Naturally Occurring Androgenesis in Vertebrates". *Royal Society Open Science* 4 (5): 170200. <https://doi.org/10.1098/rsos.170200>.
- Nakamura, Takuma, Ryusuke Yokoyama, Etsuko Tomita, a Kazuhiko Nishitani. 2003. „Two Azuki Bean XTH Genes, VaXTH1 and VaXTH2, with Similar Tissue-Specific Expression Profiles, are Differently Regulated by Auxin". *Plant and Cell Physiology* 44 (1): 16–24. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg002>.
- Olsen, Stian, Zoë A. Popper, a Kirsten Krause. 2016. „Two sides of the same coin: Xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases in host infection by the parasitic plant *Cuscuta*". *Plant Signaling & Behavior* 11 (3): e1145336. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1145336>.
- Ozyigit, Ibrahim I., Ertugrul Filiz, Recep Vatansever, Kuaybe Y. Kurtoglu, Ibrahim Koc, Münir X. Öztürk, a Naser A. Anjum. 2016. „Identification and Comparative Analysis of H₂O₂-Scavenging Enzymes (Ascorbate Peroxidase and Glutathione Peroxidase) in Selected Plants Employing Bioinformatics Approaches". *Frontiers in Plant Science* 7 (březen). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00301>.
- Paunesku, T., S. Mittal, M. Protić, J. Oryhon, S. V. Korolev, A. Joachimiak, a G. E. Woloschak. 2009. „Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): Ringmaster of the Genome". *International Journal of Radiation Biology*, červenec. <https://doi.org/10.1080/09553000110069335>.
- Peterson, Ross, Janet P. Slovin, a Changbin Chen. 2010. „A Simplified Method for Differential Staining of Aborted and Non-Aborted Pollen Grains". *International Journal of Plant Biology* 1 (2): 66–69. <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e13>.
- Popova, Teodora, Stanislava Grozeva, Velichka Todorova, Gergana Stankova, Nikolay Anachkov, a Velichka Rodeva. 2016. „Effects of Low Temperature, Genotype and Culture Media on in Vitro Androgenic Answer of Pepper (*Capsicum Annuum* L.)". *Acta Physiologiae Plantarum* 38 (11): 273. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2294-4>.

- Porta, Helena, a Mario Rocha-Sosa. 2002. „Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features". *Plant Physiology* 130 (1): 15–21. <https://doi.org/10.1104/pp.010787>.
- Ramos, Javier, Manuel A. Matamoros, Loreto Naya, Euan K. James, Nicolas Rouhier, Shusei Sato, Satoshi Tabata, a Manuel Becana. 2009. „The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes". *New Phytologist* 181 (1): 103–14. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02629.x>.
- Seguí-Simarro, José M. 2010. „Androgenesis Revisited". *The Botanical Review* 76 (3): 377–404. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9056-6>.
- Shim, Ie-Sung, Yukie Momose, Akihiro Yamamoto, Dea-Wook Kim, a Kenji Usui. 2003. „Inhibition of Catalase Activity by Oxidative Stress and Its Relationship to Salicylic Acid Accumulation in Plants". *Plant Growth Regulation* 39 (3): 285–92. <https://doi.org/10.1023/A:1022861312375>.
- Schwander, Tanja, a Benjamin P. Oldroyd. 2016. „Androgenesis: where males hijack eggs to clone themselves". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371 (1706): 20150534. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0534>.
- Soriano, Mercedes, Hui Li, a Kim Boutilier. 2013. „Microspore Embryogenesis: Establishment of Embryo Identity and Pattern in Culture". *Plant Reproduction* 26 (3): 181–96. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0226-7>.
- Strzalka, Wojciech, Anna Kaczmarek, Barbara Naganowska, a Alicja Ziemienowicz. 2010. „Identification and functional analysis of PCNA1 and PCNA-like1 genes of *Phaseolus coccineus*". *Journal of Experimental Botany* 61 (3): 873–88. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp354>.
- Strzalka, Wojciech, a Alicja Ziemienowicz. 2011. „Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation". *Annals of Botany* 107 (7): 1127–40. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>.
- Sun, Tingting, Feng Liu, Wenju Wang, Ling Wang, Zhuqing Wang, Jing Li, Youxiong Que, Liping Xu, a Yachun Su. 2018. „The Role of Sugarcane Catalase Gene ScCAT2 in the Defense Response to Pathogen Challenge and Adversity Stress". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092686>.

- Testillano, Pilar S. 2019. „Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement". *Journal of Experimental Botany* 70 (11): 2965–78. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>.
- Touraei, Alisher, Oscar Vicente, a Erwin Heberle-Bors. 1997. „Initiation of Microspore Embryogenesis by Stress". *Trends in Plant Science* 2 (8): 297–302. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89951-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89951-7).
- Wang, Mei, Sandra van Bergen, a Bert Van Duijn. 2000. „Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding". *Plant Physiology* 124 (2): 523–30. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.523>.
- Weigt, Dorota, Angelika Kiel, Idzi Siatkowski, Joanna Zypych-Walczak, Agnieszka Tomkowiak, a Michał Kwiatek. 2019. „Comparison of the Androgenic Response of Spring and Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Plants* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/plants9010049>.
- Xu, Wei, Paul Campbell, Ajay K. Vargheese, a Janet Braam. 1996. „The Arabidopsis XET-Related Gene Family: Environmental and Hormonal Regulation of Expression". *The Plant Journal* 9 (6): 879–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060879.x>.
- Yang, Xue-Yong, Wei-Jie Jiang, a Hong-Jun Yu. 2012. „The Expression Profiling of the Lipoxygenase (LOX) Family Genes During Fruit Development, Abiotic Stress and Hormonal Treatments in Cucumber (*Cucumis Sativus* L.)". *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2): 2481–2500. <https://doi.org/10.3390/ijms13022481>.
- Yang, Zheng, Amna Mhamdi, a Graham Noctor. 2019. „Analysis of Catalase Mutants Underscores the Essential Role of CATALASE2 for Plant Growth and Day Length-Dependent Oxidative Signalling". *Plant, Cell & Environment* 42 (2): 688–700. <https://doi.org/10.1111/pce.13453>.
- Yokoyama, Ryusuke, a Kazuhiko Nishitani. 2001. „A Comprehensive Expression Analysis of all Members of a Gene Family Encoding Cell-Wall Enzymes Allowed us to Predict cis-Regulatory Regions Involved in Cell-Wall Construction in Specific Organs of Arabidopsis". *Plant and Cell Physiology* 42 (10): 1025–33. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce154>.
- York, William S, Qiang Qin, a Jocelyn K. C Rose. 2004. „Proteinaceous Inhibitors of Endo- β -Glucanases". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*,

Plant proteinaceous inhibitors of glycosidases, 1696 (2): 223–33.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.07.003>.

Żur, Iwona, Ewa Dubas, Elżbieta Golemic, Magdalena Szechyńska-Hebda, Franciszek Janowiak, a Maria Wędzony. 2008. „Stress-Induced Changes Important for Effective Androgenic Induction in Isolated Microspore Culture of Triticale (×Triticosecale Wittm.)". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94 (3): 319–28.
<https://doi.org/10.1007/s11240-008-9360-6>.