

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Založení a regenerace prašnickové kultury somatických hybridů  
diploidního *Solanum tuberosum* a *Solanum bulbocastanum***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Eva Suková**

**Studijní obor: Šlechtění rostlin**

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

© 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Založení a regenerace prašnickové kultury somatických hybridů diploidního *Solanum tuberosum* a *Solanum bulbocastanum* vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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. 2018

podpis autora práce:

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení, ochotu a cenné rady poskytnuté v průběhu práce a Ing. Ivě Viehmannové, Ph.D. za pomoc s průtokovou cytometrií.

Poděkování též patří pracovníkům Demonstračního a experimentálního pracoviště FAPPZ ČZU v Praze za jejich péči při pěstování rostlinného materiálu, potřebného k realizaci experimentální části této práce.

V neposlední řadě patří mé díky i mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

# Založení a regenerace prašnickové kultury somatických hybridů diploidního *Solanum tuberosum* a *Solanum bulbocastanum*

## Souhrn

Indukovaná androgeneze v prašnickových, pylových a mikrosporových kulturách patří k nejčastěji používaným metodám pro produkci haploidních rostlin, které se využívají ve šlechtitelských programech. Princip této metody spočívá v přeprogramování gametofytické cesty vývoje mikrospor na sporofytickou působením fyzikálních nebo chemických faktorů na celé květenství, poupata nebo izolované prašníky.

Neexistuje standardní protokol pro tvorbu rostlin prostřednictvím indukované androgeneze, přesto genotyp, fyziologický stav a podmínky růstu dárcovských rostlin, stupeň vývoje pylu, stresové předošetření květních pupenů nebo prašníků a prostředí a podmínky kultivace *in vitro* jsou faktory, které výrazně ovlivňují reakci prašníků na kultivaci *in vitro*.

Tato práce byla zaměřena na navržení a ověření metodiky pro realizaci indukované androgeneze u brambor metodou prašnickových kultur s následnou organogenezí. Dosažené výsledky experimentu nejsou jednoznačné a jen naznačují určité trendy a hypotézy.

Nejvhodnější poupata pro prašnickovou kulturu mají velikost 2-3 mm. Statisticky bylo prokázáno, že stresové předošetření a typ média měly vliv na proces indukované androgeneze. Jako základní indukční médium bylo použito 100% MS s přídavkem sacharózy, agaru a aktivního uhlí nebo 50% MS s přídavkem sacharózy a agaru. Na médiích s přídavkem aktivního uhlí došlo k odezvě prašníků u všech testovaných genotypů. Na médiu bez přídavku aktivního uhlí s rostlinnými růstovými regulátory benzyladenin a kyselina naftyloctová byl získán nejvyšší počet kalusů i přesto, že u některých genotypů nedošlo k odezvě prašníků.

U genotypu REG 42F došlo k organogenezi na regeneračním médiu 100% MS s přídavkem sacharózy a agaru a rostlinnými růstovými regulátory thidiazuron a kyselina gibberelová. Metodou průtokové cytometrie bylo prokázáno, že jedna zregenerovaná rostlina je tetraploidní a dvě jsou dihaploidní. Zregenerované rostliny jsou udržovány v podmínkách *in vitro*, do nesterilního prostředí se je zatím převést nepodařilo.

Klíčová slova: *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, *in vitro* kultury, androgeneze, prašnickové kultury

# **Establishment and regeneration anther culture of diploid somatic hybrids *Solanum tuberosum* and *Solanum bulbocastanum***

## **Summary**

Induced androgenesis via anther, pollen and microsporic cultures are the most widely used methods for production of haploid plants. Haploid plants are commonly used in breeding programs. The principle of induced androgenesis lies in reprogramming of microspores from gametophytic to sporophytic development. Physical and chemical factors can be used to treat whole inflorescence, flower-buds or isolated anthers for reprogramming.

There is no standardised protocol for production of plants via induced androgenesis. The genotype, physiological status and growth conditions of donor plants, pollen developmental stage, stress pre-treatment of flower-buds or anthers and *in vitro* cultivation conditions can play significant role in anther response to *in vitro* conditions.

The aim of this thesis was to design and verify a protocol for induced androgenesis specific to potatoes using the anther culture. The obtained results suggest certain trends.

The optimal size of flower-buds used for anther culture is 2-3 mm. The physical stress pre-treatment and the used induction medium were statistically proven to influence the induced androgenesis. The two primarily used induction media were 100% MS medium with sucrose, agar and activated charcoal and 50% MS medium with sucrose and agar. The addition of activated charcoal resulted in response of anthers of all tested genotypes. The lack of activated charcoal and addition of plant growth factors (benzyladenine and naphthylacetic acid) resulted in the highest response of anthers in certain genotypes and no response in others.

Induced androgenesis in genotype REG 42F resulted in organogenesis on regeneration medium 100% MS medium with sucrose, agar and plant growth regulators thidiazuron and gibberellic acid. The ploidy of regenerants was detected using flow cytometry. One of the regenerated plants was tetraploid and two were dihaploid. The regenerated plants are currently grown in *in vitro* conditions. Move to non-sterile conditions is so far unsuccessful.

Keywords: *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, *in vitro* culture, androgenesis, anther culture

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
3.1	Charakteristika čeledi <i>Solanaceae</i> .....	10
3.1.1	Taxonomické klasifikace čeledi <i>Solanaceae</i> .....	10
3.1.2	Původ a výskyt rodu <i>Solanum</i> .....	13
3.1.3	Cytogenetická charakteristika rodu <i>Solanum</i> .....	14
3.2	Lilek brambor ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).....	16
3.2.1	Použité rostlinné zdroje a jejich charakteristika .....	16
3.3	Embryogeneze vyšších rostlin.....	16
3.3.1	Gametofytická embryogeneze.....	19
3.3.1.1	Gynogeneze .....	19
3.3.1.2	Androgeneze.....	20
3.4	Indukovaná androgeneze.....	21
3.4.1	Faktory ovlivňující androgenetickou indukci .....	23
3.4.1.1	Genotyp .....	23
3.4.1.2	Fyziologický stav a podmínky růstu dárcovské rostliny .....	23
3.4.1.3	Stádium vývoje pylu.....	24
3.4.1.4	Stresové předošetření .....	25
3.4.1.5	Povrchová sterilizace pupat a preparace prašníků.....	29
3.4.1.6	Kultivační podmínky.....	30
3.4.1.6.1	Fyzikální podmínky .....	30
3.4.1.6.2	Chemické podmínky kultivace – kultivační média .....	31
3.4.1.7	Morfogenní vývoj, přeprogramování genové exprese a regenerace rostlin 32	
3.4.1.8	Charakterizace zregenerovaných rostlin .....	34

3.4.1.8.1	Analýza ploidie .....	34
3.4.1.8.2	Průtoková cytometrie.....	34
3.4.1.8.3	Detekce homozygotnosti .....	35
3.4.2	Androgeneze brambor .....	35
3.4.2.1	Vliv genotypu .....	36
3.4.2.2	Vliv vývojového stádia pylu .....	37
3.4.2.3	Vliv stresového předošetření .....	38
3.4.2.4	Vliv fyzikálních a chemických faktorů .....	38
3.4.2.5	Pylová kultura .....	40
3.4.2.6	Využití techniky prašnickových kultur a haploidů .....	40
<b>4</b>	<b>Materiál a metody zpracování .....</b>	<b>42</b>
4.1	Rostlinný materiál .....	42
4.1.1	Odběr rostlinného materiálu.....	42
4.1.2	Stanovení vývojového stádia pylových zrn .....	42
4.1.3	Stresové předošetření pupat .....	43
4.1.4	Sterilizace předošetřených pupat .....	43
4.1.5	Kultivace prašníků .....	43
4.1.5.1	Příprava médií .....	43
4.1.5.2	Izolace prašníků.....	44
4.1.5.3	Indukce kalusů.....	45
4.1.6	Regenerace celistvých rostlin.....	45
4.1.7	Testování ploidie zregenerovaných rostlin .....	47
4.1.8	<i>In vitro</i> kultivace rostlin a převod do nesterilních podmínek .....	47
4.1.9	Metodika zpracování a vyhodnocení výsledků.....	48
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>49</b>
5.1	Vliv faktorů na tvorbu kalusů .....	49
5.1.1	Vliv stresového předošetření.....	50

5.1.2	Vliv genotypů.....	51
5.1.3	Vliv složení médií na indukci kalusů.....	53
5.1.4	Testování regeneračního média .....	55
5.1.5	Testování ploidie zregenerovaných rostlin .....	56
5.1.6	Převod do nesterilních podmínek <i>ex vitro</i> .....	58
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratek.....</b>	<b>73</b>



# 1 Úvod

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově k nejrozšířenějším kulturním plodinám. Pěstuje se pro podzemní stonkové hlízy, které jsou jednou ze základních potravin. Obsahují převážně sacharidy, jsou ale také důležitým zdrojem draslíku a dalších minerálů, vlákniny, vitamínu C a B6 a esenciálních aminokyselin. Hlízy se dále využívají jako krmivo pro hospodářská zvířata a jako průmyslová surovina na výrobu lihu a škrobu. Své užití mají i v tradičním lidovém léčitelství. Název *Solanum tuberosum* je používán jak pro původní krajové populace brambor z oblastí Chile a And, tak i pro kultivary, které se od konce šestnáctého století vyvíjely mimo jižní Ameriku. Moderní kultivary jsou produkty šlechtění mezi kulturními a původními nekulturními druhy.

Vypěstování nové odrůdy tradičními šlechtitelskými metodami trvá obvykle 15-20 let. Důvodem je především sexuální neslučitelnost jednotlivých druhů brambor. Tento proces lze výrazně zrychlit využitím moderních biotechnologických metod zaměřených na produkci haploidních či dihaploidních rostlin.

V přírodě lze pozorovat výskyt haploidních rostlin, které vznikly spontánně ze samičích gametofytů procesem gynogeneze nebo samčích gametofytů procesem androgeneze. Pro řízenou produkci haploidů je využívána především indukovaná androgeneze v prašnickových, pylových a mikrosporových kulturách. Hlavní výhodou této metody je velké množství gametofytů s geny vhodnými pro šlechtění a její relativní jednoduchost. Spouštěčem pro navození nevratného přechodu gametofytu z gametofytické dráhy vývoje na dráhu sporofytickou je obvykle stresové předošetření, které může být aplikováno buď *in vivo* nebo *in vitro*.

Pro polyploidizaci haploidních rostlin se používají depolymerizační alkaloidy, především kolchicin. Takto získané dihaploidy jsou zcela homozygotní a představují důležitý nástroj nejen pro šlechtění rostlin ale i pro výzkum v oblasti genetiky.

## 2 Cíle práce

Cílem této práce bylo odvození prašnickové kultury vybraných 4n somatických hybridů (*Solanum tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) rezistentních k plísni bramboru a její regenerace cestou přímé či nepřímé androgenese.

Práce vychází z následujících hypotéz.

Prašnickové kultury 4n somatických hybridů mají schopnost regenerovat do diploidních rostlin (2n).

Existuje vhodná kombinace stresového předošetření a médií pro indukovanou androgenezi technikou prašnickové kultury se ziskem regenerantů.

Jednotlivé kroky vedoucí ke splnění cíle byly

- na základě výsledků bakalářské práce (Suková, 2016) vybrat vhodné genotypy tetraploidních somatických hybridů (*Solanum tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*)
- rozšířit formy stresového předošetření a typy médií pro indukovanou androgenezi použité v bakalářské práci a otestovat jejich účinnost v praktické části práce
- navrhnout a otestovat média pro organogenezu
- v případě zisku regenerantů, zjistit jejich ploidii.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Charakteristika čeledi *Solanaceae*

#### 3.1.1 Taxonomické klasifikace čeledi *Solanaceae*

Taxonomické členění čeledi *Solanaceae* je velmi komplexní. Čeleď *Solanaceae* obsahuje přibližně 90 rodů, které jsou dále rozděleny do 3000-4000 druhů. Největším rodem čeledi *Solanaceae* je rod *Solanum*. Tento rod zahrnuje přibližně 1500-2000 druhů. Rod *Solanum* je dále rozdělen do sekcí, subsekcí a sérií (Tabulka 1). Klasifikace rodu *Solanum* je založena hlavně na morfologických znacích, jako je tvar trsu, tvar plodů, tvar listů a forma prašníků a blizny (Hawkes, 1994). Taxonomické zařazení brambor na úrovni druhu je komplikované díky sexuální kompatibilitě mezi mnoha druhy, mezidruhovému křížení, směsí sexuální a asexuální reprodukce, autoployploidii, druhové divergenci, fenotypové plasticitě a následné vysoké morfologické podobnosti mezi druhy (Volkov *et al.*, 2003; Spooner, 2009).

V posledních letech došlo k použití molekulárně biologických metod k objasnění evolučních a fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Solanum*. Přesto v dnešní době existují různé taxonomické klasifikace prezentovány různými autory (Huamán *et Spooner*, 2002; Ovchinnikova *et al.*, 2011; Spooner *et Hijmans*, 2001). Klasifikace podle Hawkese (1990), která vychází z morfologických znaků, rozpoznává 228 druhů. Naproti tomu novější klasifikace podle Spoonera *et al.* (2007), založená na genomové analýze, rozpoznává pouze 110 druhů. I přesto, že genetická variabilita rostlin rodu *Solanum* je intenzivně studována, nebylo zatím dosaženo všeobecného konsenzu na jeho taxonomické klasifikaci, ani na evolučních vztazích mezi jednotlivými druhy.

**Tabulka 1:** Taxonomické rozdělení rodu *Solanum* na sekce, subsekcce a série (Hawkes, 1990, 1994, Volkov *et al.*, 2003). Toto taxonomické rozdělení je založeno na morfologických znacích, jako je tvar trsu, tvar plodů, tvar listů, forma prašníků a blizny.

Rod	sekce	subsekcce	série	vlastnost
<i>Solanum</i>	<i>Petota</i>	<i>Estolonifera</i>	<i>Etuberosa</i>	Netvoří hlízy ani
			<i>Juglandifora</i>	stolony
		<i>Potatoe</i>	19 sérií	Tvoří hlízy

Většina druhů rodu *Solanum* jsou nekulturním, divoce rostoucí druhy. Tyto divoké druhy však poskytují velký genetický potenciál pro šlechtění.

Taxonomické rozdělení kulturních, obdobně jako nekulturních, brambor je komplikované. Hawkes (1990) na základě morfologických znaků navrhl jejich rozdělení do sedmi druhů. Novější studie (Spooner *et al.*, 2007), která využila mikrosatelitních markerů a markerů chloroplastové DNA u 742 genotypů krajových odrůd všech kulturních druhů a jejich divokých předků, reklasifikovala kulturní brambory do pouze čtyř druhů (Tabulka 2).

**Tabulka 2:** Taxonomické třídění kulturních druhů brambor dle Hawkes (1990) a Spoonera *et al.* (2007), která reflektuje druhovou spojitost mezi jednotlivými klasifikacemi

<b>Hawkes (1990)</b>	<b>Spooner <i>et al.</i> (2007)</b>
<i>S. ajanhuiri</i>	<i>S. ajanhuiri</i>
<i>S. curtilobum</i>	<i>S. curtilobum</i>
<i>S. juzepczukii</i>	<i>S. juzepczukii</i>
<i>S. tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i>
ssp. <i>andigena</i> Hawkes	skupina Andigenum
ssp. <i>tuberosum</i>	skupina Chilotanum
<i>S. chaucha</i>	<i>S. tuberosum</i> (skupina Andigenum)
<i>S. phureja</i>	<i>S. tuberosum</i> (skupina Andigenum)
<i>S. stenotomum</i>	<i>S. tuberosum</i> (skupina Andigenum)

Podle obou taxonomických rozdělení jsou druhy *Solanum ajanhuiri*, *Solanum curtilobum* a *Solanum juzepczukii*, popsány následovně:

- *Solanum ajanhuiri* Juz. a Bukasov – diploidní druh, který vznikl přirozeným křížením mezi diploidními kultivary skupiny *S. tuberosum* L. skupina Andigenum a tetraploidním divokým druhem *S. bolivense* (*S. megistacrolobum*)
- *Solanum curtilobum* pentaploidní druh ( $2n = 5x = 60$ ) vzniklý pravděpodobně hybridizací mezi tetraploidními formami *S. tuberosum* L. skupina Andigenum a *S. juzepczukii* Bukasov (Hawkes 1990, Rodríguez *et al.* 2010)
- *Solanum juzepczukii* Bukasov – triploidní druh ( $2n = 3x = 36$ ) vytvořený hybridizací mezi diploidním kultivarem skupiny *S. tuberosum* L. skupina Andigenum a tetraploidním divokým druhem *S. acaule* Bitter.

- Původ a taxonomie *Solanum tuberosum*, lilku bramboru, je dle jednotlivých autorů rozdílná. Starší a častěji používaná klasifikace dle Hawkesa (1990) rozděluje *S. tuberosum* do dvou poddruhů: *tuberosum* a *andigena*. Oba druhy jsou tetraploidní ( $2n = 4x = 48$ ). Poddruh *andigena* se vyskytuje ve Střední a Jižní Americe a vykazuje širokou škálu morfologických variací jako např. barvy a tvarů květů a hlíz. Teorie o původu tohoto poddruhu zahrnuje přirozenou hybridizaci mezi *S. stenotomum* a *S. sparsipilum*, následovanou zdvojením chromozomů (Cribb *et* Hawkes 1986) nebo jednoduchým zdvojením chromozomu *S. stenotomum* a pozdější hybridizací *S. stenotomum* a *S. chacoense* (Hawkes, 1994). Poddruh *tuberosum* zahrnuje většinu současných odrůd brambor. Geograficky lze jeho původ zařadit na ostrov Chiloé v souostroví Chiloé poblíž Chile. Tato odrůda pravděpodobně vznikla ze spp. *andigena* adaptací na dlouhou délku dne (Hawkes, 1994).

Novější studie Spooner *et al.* (2005a) předpokládá, že jediným předkem kulturního *Solanum tuberosum* byl divoký druh *Solanum brevicaule* z jižního Peru. Nicméně další autoři navrhují různé teorie o původu kulturních druhů brambor (Hawkes, 1994; Huamán *et* Spooner, 2002).

Kromě těchto čtyř druhů Hawkes (1994) popsal další tři samostatné druhy *S. tuberosum*. Jsou jimi:

- *S. chaucha* – kulturní triploidní druh ( $2n = 3x = 36$ ), který pravděpodobně vznikl přirozenou hybridizací *S. tuberosum* ssp. *andigena* a *S. stenotomum*. Vyskytuje se v Peru v nadmořské výšce od 2100 m do 4100 m, částečně v Bolívii, a zřídka i v Ekvádoru a Kolumbii.
- *S. phureja* – diploidní druh ( $2n = 2x = 24$ ). Vznikl ze *S. stenotomum* a byl identifikován na základě adaptace na krátký den a krátkou dormanci hlíz. Vyskytuje se v oblastech centrálního Peru, v Ekvádoru, Kolumbii a Venezuele.
- *S. stenotomum* – diploidní druh ( $2n = 2x = 24$ ). Hawkes rozdělil tento druh na dva poddruhy: *stenotomum* a *goniocalyx*. *S. stenotomum* se pěstuje od centrálního Peru až po centrální Bolívii. Pravděpodobně je to nejprimitivnější forma kulturního bramboru. *S. stenotomum* vykazuje rozmanitost uvnitř druhu, což naznačuje, že se jedná o první domestikovaný brambor pocházející z diploidních druhů divokých brambor.

### 3.1.2 Původ a výskyt rodu *Solanum*

Brambory (rostliny rodu *Solanum*) pocházejí z Jižní a Střední Ameriky. První záznamy o výskytu brambor pocházejí z oblasti jižního Chile, kde byly brambory konzumovány již před 13 tisíci lety, v dobách před nástupem moderního zemědělství.

V současnosti se nekulturní druhy brambor vyskytují ve velké části severní Ameriky, od jihozápadních USA až po Mexiko a Střední Ameriku. V Jižní Americe se vyskytují téměř v každé zemi, především v oblasti And, ve Venezuele, Kolumbii, Ekvádoru, Peru, Bolívii a Argentině (Hijmans *et al.*, 2003). Největší počet druhů se vyskytuje v Peru (Hijmans *et al.*, 2001). Hawkes (1994) uvádí, jako tradičně zmiňované tři zeměpisné oblasti výskytu nekulturních druhů bramborů:

- rovníková oblast s krátkodenními druhy (série *Andigena*),
- nížinná oblast Chile a přilehlých ostrovů s dlouhodobými druhy (série *Tuberosa* a *Etuberosa*) a
- nížinná oblast Uruguaye (série *Commerionianna*).

Rozsáhlý výskyt divokých druhů a jejich schopnost přizpůsobit se široké škále stanovišť, jako je zeměpisná šířka (od jihozápadních USA po Argentinu), nadmořská výška (od pobřeží k Andským horám), různým typům půd a srážkovým poměrům, poskytují bohatý, jedinečný a různorodý zdroj genetické variability, který může být zdrojem různých genů při šlechtění brambor (Hawkes, 1994).

Kulturní druhy brambor lze rozdělit na původní krajové odrůdy, které se v současné době pěstují jenom v Jižní Americe, a na vyšlechtěné odrůdy pěstované po celém světě.

Oblast původu prvních brambor dovezených do Evropy je sporná. Autoři navrhují dvě možné oblasti původu – oblast Chiloé v Chile nebo oblast Andských vysočin Bolívie, Peru a severní Argentiny (Hawkes, 1994). Molekulární analýza kulturních druhů brambor pěstovaných v dnešní době v Evropě naznačuje dvě hypotézy.

První možností je, že do Evropy byly nejdříve dovezeny Andské odrůdy bramboru, které se (vlivem klimatu, délkou dne) konvergencí přiblížily Chilským odrůdám. Druhou možnou hypotézou je, že obě odrůdy bramboru byly dovezeny a rozšířeny v Evropě současně, ale pouze Chilské odrůdy přežily epidemii plísňě bramborové (*Phytophthora infestans*) v 50. letech 19. století (Spooner *et al.*, 2005).

### 3.1.3 Cytogenetická charakteristika rodu *Solanum*

Reprodukční vlastnosti brambor jsou jedinečné. Mohou se rozmnožovat pohlavním i vegetativním způsobem. Obě rozmnožovací strategie jsou řízeny různými mechanismy, které regulují křížení mezi jednotlivými druhy a odrůdami. Příkladem těchto mechanismů je produkce gamet s neredukovaným počtem chromozomů ( $2n$ ), různé úrovně ploidie, Endosperm balance number (EBN) - regulátor interploidního a mezidruhového křížení (Carputo *et* Barone, 2005). Všechny tyto mechanismy jsou velmi důležité i v taxonomických a fylogenetických klasifikacích.

Rozsah úrovně ploidie, který se vztahuje k základnímu chromozomovému číslu 12, se u rodu *Solanum* pohybuje od diploidní až po hexaploidní (Watanabe, 2002). Většina (80 %) divokých druhů je diploidních a u mnohých dalších druhů může dojít k polyploidizaci a vzniku tetraploidů pomocí  $2n$  gamet. Jen málo druhů má dvě nebo více úrovní ploidie, které jsou morfologicky nerozlišitelné (Carputo *et* Barone, 2005). Watanabe *et al.*, (1991) uvádí, že kulturní druhy bramboru mohou být diploidní ( $2n = 2x = 24$ ), triploidní ( $2n = 3x = 36$ ), tetraploidní ( $2n = 4x = 48$ ) nebo pentaploidní ( $2n = 5x = 60$ ).

Kulturní brambor je považován za autopolyploida a jako takový vykazuje tetrasomickou dědičnost. Tetraploidní druhy brambor ( $2n = 4x = 48$ ), obsahují čtyři sady chromozomů ( $4x$ ) v generaci sporofytů ( $2n$ ) se 48 chromozomy v každé somatické buňce. Gamety ( $n$ ) z kultivaru jsou  $2x = 24$  (Hawkes, 1990).

Haploidy jsou sporofyty s gametofytickým počtem chromozomů. U tetraploidních brambor jsou haploidy běžně nazývány dihaploidy, což naznačuje, že obsahují dvě sady chromozomů. Haploidy i dihaploidy jsou nejčastěji využívány ve šlechtitelském procesu pro křížení kulturních a nekulturních brambor. Mohou být použity i k měření genetické zátěže tetraploidů, z nichž jsou odvozeny, protože odhalují škodlivé alely, které byly v tetraploidech skryty (De Jong *et al.*, 1971).

Přírodní populace brambor jsou izolovány vnějšími a vnitřními hybridizačními bariérami (Camadro *et al.*, 2004). Přesto dochází ke spontánnímu mezidruhovému křížení a vzniku nových hybridů (Larrosa *et al.*, 2012). V rámci šlechtitelského procesu, jehož cílem je vytvoření nových odrůd, jsou hybridizační bariéry odstraňovány cíleně (Bajaj, 1990).

Za vnější hybridizační bariéru je považována především geografická nebo časová oddělenost jednotlivých populací brambor (Flegr, 2007).

Vnitřní bariéry jsou řízeny geneticky a lze je rozdělit do dvou skupin:

- pre-zygotické – založeny na principu tzv. pylovo-pestíkové inkompatibility
- post-zygotické – související s abnormálním vývojem endospermu (Camadro *et al.*, 2004)

Většina diploidních tuberizujících druhů *Solanum* je gametofyticky autoinkompatibilních. Jedná se o inkompatibilitu podmíněnou vzájemným působením haploidního genomu každého pylového zrna s diploidním genomem pletiva čnělky, kterou pylová láčka prorůstá do semeníku k vaječné buňce (Pandey, 1962).

Cytoplazmaticko-genetická samčí sterilita poskytuje izolační mechanismus, který pomáhá udržovat integritu sympatrických druhů. Je běžná u kultivarů brambor a byla také zaznamenána u řady hybridů kulturních a divokých brambor (Larrosa *et al.*, 2012).

Další důležitá biologická charakteristika brambor je spojena se specifickou teorií Endosperm Balance Number (EBN), která byla formulována počátkem 80. let a vysvětlovala mechanismus regulace vývoje endospermu. Vývoj endospermu je rozhodující pro tvorbu fertálních semen. Brink *et Cooper* (1947) jako první uvedli, že selhání endospermu je primárním důvodem neúspěchu při interploidní a mezidruhové hybridizaci, což se v konečném důsledku projeví odumřením embrya. Dle EBN je pro normální vývoj endospermu zapotřebí, aby byl poměr mateřské a otcovské komponenty 2:1 (Johnston *et al.*, 1980). EBN nezávisí na úrovni ploidie a má aditivní charakter. Kromě toho, že přispívá k opakované polyploidaci, funguje i jako izolační mechanismus omezující interploidní a mezidruhové křížení tuberizujících druhů rodu *Solanum* (Ortiz *et Ehlenfeldt*, 1992).

V sekci *Petota* lze jednotlivým druhům na základě jejich schopnosti hybridizace přidělit EBN. Mohou se vyskytovat tyto kombinace ploidie a EBN: 6x (4EBN), 4x (4EBN), 4x (2EBN), 2x (2EBN) a 2x (1EBN). Kulturní *Solanum tuberosum* má 4EBN, zatímco většina nekulturních druhů, ať už diploidních nebo tetraploidních, má 2EBN. Fertální semena jsou produkována z hybridizace rostlin se shodnými hodnotami EBN, pokud tomu nebrání jiné hybridizační bariéry (Hanneman, 1994). Existuje několik přírodních a umělých mechanismů, které obcházejí neslučitelnost EBN, např. přirozený proces produkce gamet s neredukovaným počtem chromozomů (2n) nebo umělá polyploidizace. Navzdory systému EBN lze brambory různých skupin kombinovat somatickou fúzí *in vitro* (Carputo *et Barone*, 2005).



## 3.2 Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří mezi hlíznaté dvouděložné rostliny. Je to vytrvalá jednoletá rostlina. Mateřská rostlina je tvořena z hlízy, která po vyčerpání zásobních látek v průběhu vegetace odumírá. Na konci vegetačního období odumírá i celá nadzemní část, kromě semen a nově vytvořených (dceřiných) hlíz (Vokál, 2013).

### 3.2.1 Použité rostlinné zdroje a jejich charakteristika

Genotypy použité v této práci jsou zregenerované rostliny z prýtů kalusů, získaných fúzí kompletních protoplastů dvou sexuálně inkompatibilních druhů *Solanum bulbocastanum* a *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*. REG 32F, REG 38F, REG 39F, REG 41F, REG 42F, REG 70F jsou zregenerované rostliny z prýtů jednoho kalusu a REG 46F, REG 47F, REG 50F, REG 68F z druhého kalusu.

*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* je diploidní ( $2n = 24$ ) kulturní druh. *Solanum bulbocastanum* je diploidní ( $2n = 24$ ) nekulturní druh rodu *Solanum*, s rasově nespecifickou rezistencí k *Phytophthora infestans* (Sedláková, 2010).

## 3.3 Embryogeneze vyšších rostlin

Životní cyklus rostlin probíhá prostřednictvím střídajících se generací sporofytů a gametofytů. Sporofyt je u vyšších rostlin dominantní a nejnápadnější částí buněčného cyklu. Buňky sporofytu obsahují dvě sady chromozomů, každou od jednoho z rodičů ( $2n$ ). Na druhou stranu gametofyt se obvykle skládá z haploidních buněk, které vznikají pomocí meiózy v samčích a samičích pletivech sporofytu. Počet chromozomů v buňkách gametofytů je zredukován na polovinu ( $n$ ). Pohlavní buňky gametofytu vznikají pouze mitózou. V normálních podmínkách po splynutí samčí a samičí pohlavní buňky vzniká diploidní zygota. Ze zygoty se dělením začne vyvíjet embryo, které je uloženo v semeni. Základem embrya nemusí být vždy zygota a embryo se může vyvíjet i bez oplození, apomikticky. Rostliny jsou v tomto případě haploidní, tj. počet chromozomů je  $n$  (Novák *et* Skalický, 2012). Haploidní rostliny mohou vzniknout spontánně nebo zásahem člověka tzv. řízenou indukci v prostředí *in vitro*

První přirozený výskyt sporofytických haploidů byl pozorován u jedovatého plevelu *Datura stramonium* L., který patří mezi divoké (nekulturní) druhy *Solanaceae*. Poté v krátkém časovém období následovaly podobné objevy u tabáku (*Nicotiana tabacum*), pšenice (*Triticum aestivum*)

a následně u několika dalších druhů. Počet zjištěných spontánních haploidů od té doby neustále narůstá. Již v roce 1974 Kasha zaznamenal jejich výskyt u více než 100 druhů krytosemenných rostlin. Příklady spontánních haploidů u některých druhů lze nalézt v práci Dunwella (2010).

Spontánní produkce haploidních rostlin přirozenou cestou je extrémně nízká. Přesto mohou vznikat díky procesům jako je gynogeneze, androgeneze, semigamie, polyembryonie a eliminace chromozomů prostřednictvím mezidruhového křížení nebo opylením nefertilním pylem.

Gynogeneze je zvláštní způsob pohlavního rozmnožování, kdy haploidní rostliny vznikají spontánně z neopylených samičích gametofytů. V případě, že haploidní rostliny vzniknou ze samčích gametofytů nebo jeho prekursor mluvíme o androgenezi.

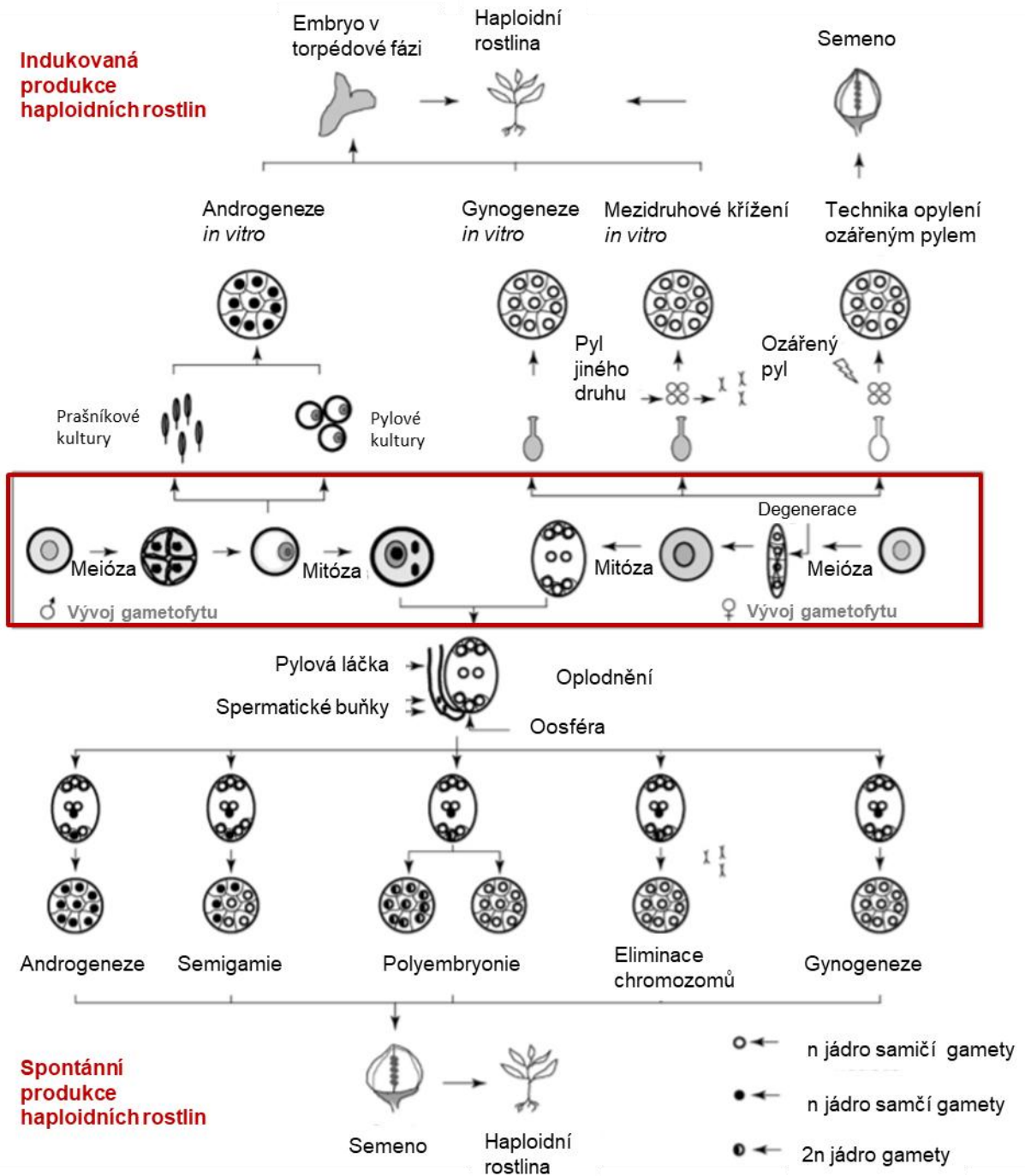
Při semigamii jádro spermatické buňky vnikne do oosféry, vyvolá zde dělení, ale nesplyne s jádrem oosféry. To vede k samostatnému vývoji a dělení oosféry i spermatické buňky. Výsledkem je heterogenní embryo.

Polyembryonie nastává oplozením synergid nebo antipod. Tím vznikne více embryí v jednom semeni, které se vyvíjejí v jednom zárodečném vaku. Při nepravé polyembryonii vznikají embrya z více zárodečných vaků uvnitř vajíčka nebo i z buněk sporofytu ve vajíčku.

Při mezidruhovém křížení vzniká haploidní embryo opylením oosféry pylem jiného druhu a následnou eliminací chromozomů pylu. Ke vzniku haploidní rostliny může dojít i opylením oosféry ozářeným pylem, který je schopen iniciovat buněčné dělení ve vajíčku a vývoj embrya (Forster *et al.*, 2007).

Mezidruhové křížení, opylování nefertilním pylem, gynogeneze či androgeneze lze alternativně realizovat v prostředí *in vitro*. kultivací izolovaných částí rostlin, např. buněk, pletiv nebo orgánů. V případě kultivace buněk gametofytu mluvíme o gametofytické embryogenezi. Tyto metody jsou často využívány ve šlechtitelském procesu s cílem získání rostlin určitých vlastností nebo haploidů (Forster *et al.*, 2007). Jednotlivé způsoby vzniku haploidů ilustruje obrázek 1.

**Obrázek 1: Způsoby vzniku haploidních rostlin** – spontánně nebo indukci samčích i samčích gametofytů v podmínkách *in vitro* (převzato a upraveno podle Forster *et al.*, 2007).



### 3.3.1 Gametofytická embryogeneze

Gametofytická embryogeneze je metoda indukované tvorby haploidních rostlin. Principem je navození nevratného přechodu samčího nebo samičího gametofytu z gametofytické dráhy vývoje na dráhu sporofytickou.

Ke gametofytické embryogenezi se častěji využívají samčí gametofyty. Hlavním důvodem je množství produkovaných gametofytů. Na jedné straně máme stovky gametofytů produkovaných v jednom prašníku, na druhé straně je pouze jediný gametofyt v oocyту. Dalším důvodem je jednodušší izolace samčích gametofytů z prašníků.

Proces, ve kterém embryo vzniklo ze samčího gametofytu, označujeme jako androgenezi, v případě, že embryo vzniklo ze samičího gametofytu, mluvíme o gynogenezi (Procházka et al., 1998).

#### 3.3.1.1 Gynogeneze

Z neopylených samičích gametofytů je možné získat haploidy cestou známou jako gynogeneze. Gynogenní embrya jsou převážně haploidní, což znamená, že pro získání požadované dihaploidní rostliny je třeba použít další biotechnologii pro zdvojení chromozomů (Bohanec, 2009).

Ke gynogenezi může dojít opylením nefertilním pylem. Při indukované gynogenezi u obilovin (*Hordeum bulbosum*, *Zea mays*) byl použit pyl jiného druhu, u melounů zase ozářený pyl. Opylením tetraploidního *Solanum tuberosum* (4x) pylem *Solanum phureja* (2x) lze získat dihaploidní rostliny. V tomto případě dvě spermatické buňky (1x) *S. phureja* fúzovali s centrálním diploidním jádrem *S. tuberosum* (4x), čímž vznikl 6x endosperm, který byl schopen podpořit vývoj dihaploidního embrya (2x) z neoploďné vaječné buňky *S. tuberosum* (De Maine, 2003). V současné době opylování nefertilním pylem patří k nejméně používaným technologiím, kvůli jeho nízké účinnosti. Používá se pouze u druhů, jako je cukrová řepa a cibule, kde se jiné techniky indukující haploidy nebo dihaploidy ukázaly jako neúspěšné (Shariatpanahi et al., 2006).

Další metodou vyvolání gynogeneze je proces indukované kultivace nezralých vajíček, který může být vyvolán mezidruhovým nebo mezirodovým křížením. Při této metodě vzniká hybridní embryo fúzí samčí gamety jednoho druhu se samičí buňkou jiného druhu. Post-zygotické bariéry inkompatibility však vedou k postupnému vylučování chromozomů samčího rodičovského druhu. Haploidní rostliny tak pocházejí výhradně ze samičí gamety a jakéhokoliv genetické pozadí samčího rodiče je odstraněno. Tento princip vzniku haploidního

embrya byl objeven v roce 1970 u druhu *Hordeum* a nyní je široce využíván pro produkci dihaploidů v programech šlechtění komerčních odrůd ječmene (Wedzony *et al.*, 2009).

### 3.3.1.2 Androgeneze

Haploidní nebo dihaploidní rostliny mohou vznikat také ze samčího gametofytu nebo jeho prekurzorů cestou známou jako androgeneze. Tato vývojová dráha nezahrnuje fertilizaci vaječné buňky a je považována za jeden z nejpozoruhodnějších příkladů buněčné totipotence. Je jedním z důležitých mechanismů adaptace rostlin, který funguje pouze za určitých okolností jako důsledek environmentálního stresu (Bonet *et al.*, 1998).

Dle původní definice byl koncept "androgeneze" omezen na samčí specifickou formu partenogeneze, cesty zahrnující sexuální reprodukci, fertilizaci oosféry (vaječné buňky) a následnou inaktivaci samičího jádra tak, aby se samčí haploidní embryo vyvíjelo v embryonálním vaku (Obrázek 2, cesta 1). Tato androgenní dráha se v přírodě vyskytuje vzácně a potenciál pro komerční využití je téměř nulový (Seguí-Simarro, 2010).

Androgenní haploidní a dihaploidní rostliny mohou být také regenerovány z kalusu, který vznikl proliferací z nezralých meiocytů (Obrázek 2, cesta 3). Princip indukované androgeneze je obdobný jako u pylového dimorfizmu *in vivo*, který byl popsán v prašnicích *Narcissus biflorus* a u mezidruhových hybridů *Solanum chacoense* × *Solanum tuberosum* (Ramanna *et Hermsen*, 1974). Při indukci v podmínkách *in vitro* musí meiocyty projít meiotickou profází I, ale již nesmí dojít k tvorbě mikrospor, tzn. nesmí být vytvořena tetrádová stěna. Ke tvorbě kalusu může docházet dvěma různými způsoby:

- (1) proliferací haploidních buněk v ještě uzavřených tetrádách, u kterých byl zastaven gametofytický program nebo
- (2) proliferací diploidních buněk, které vznikly fúzí dvou haploidních buněk, díky poškozeným, neúplným nebo chybějícím buněčným stěnám.

Indukce kalusu z nezralých meiocytů, kde jaderná fúze mezi sousedními mikrosporami vedla k vzniku mnohobuněčných struktur z diploidních proliferujících buněk, byla publikována u ječmene (Chen *et al.*, 1984). Nicméně, většina poznatků o tomto procesu pochází z výzkumu prašníkových kultur *Solanum lycopersicum* (Seguí-Simarro *et Nuez*, 2007).

Dle Dunwella (2010) je nejběžnější, nejlépe prostudovanou a nejpoužívanější technikou produkce androgenních haploidů nebo dihaploidů mikrosporová embryogeneze (Obrázek 2, cesta 2). Regenerace ze samčích gamet byla zaznamenána u více než 200 druhů patřících k rodu Solanaceae, Brassicaceae a Poaceae (Dunwell, 1986). Pro některé zemědělské plodiny jako např.

luskoviny nebo některé druhy dřevin je tato metoda nevhodná (Bajaj, 1990; Dunwell, 2010; Maluszynski *et al.*, 2003; Smykal, 2000; Touraev *et al.*, 2009).

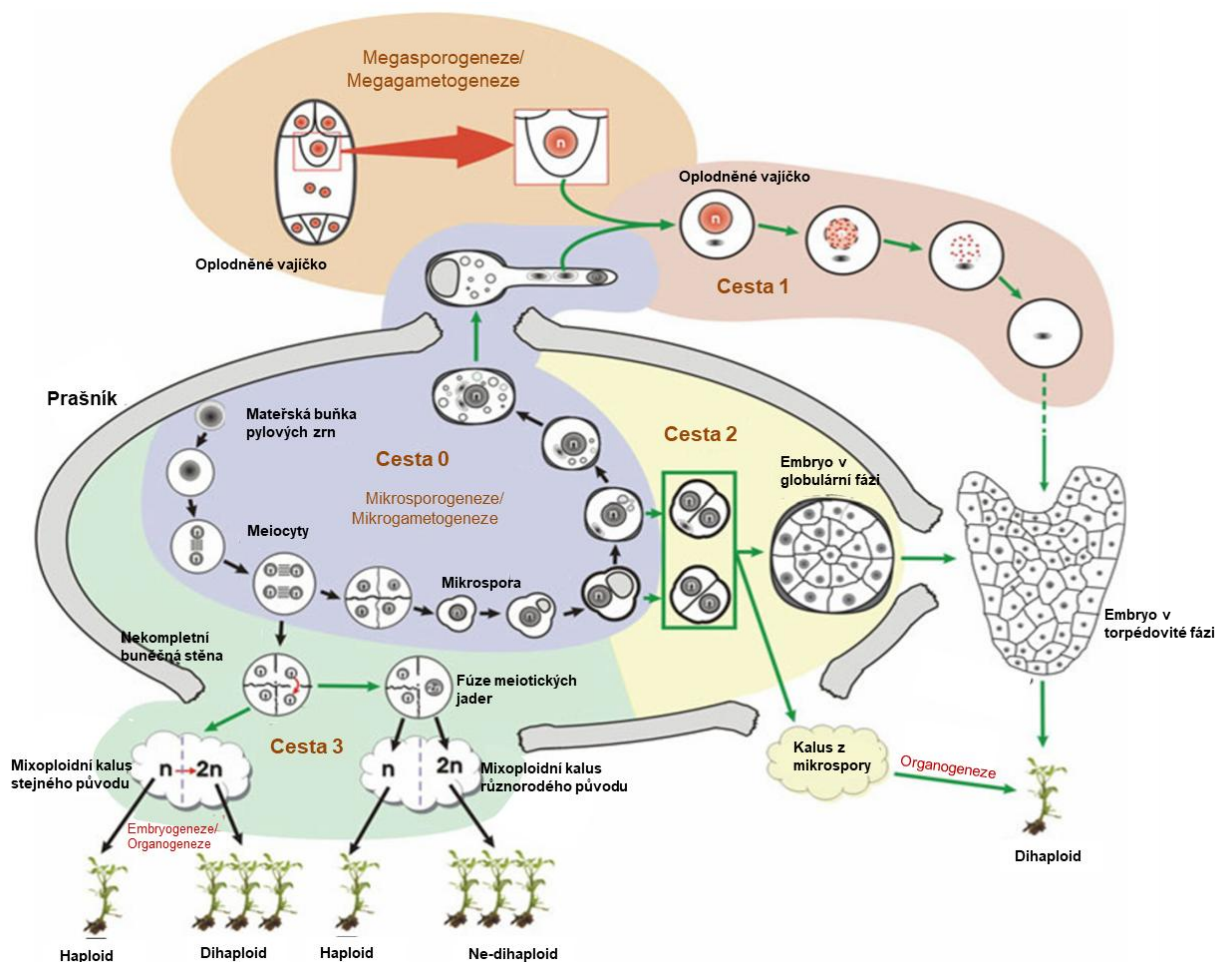
**Obrázek 2: Androgenní cesty** (Převzato a upraveno podle Seguí-Simarro, 2010)

Cesta 0: Mikrosporogeneze a mikrogametogeneze

Cesta 1: Tvorba gamet, oplodnění vajíčka bez jaderné fúze a odbourání mateřského jádra

Cesta 2: Odchylka mikrospory nebo mladého pylového zrna směrem k embryogenezi nebo tvorbě kalusu s následnou organogenezí

Cesta 3: Odchylka meiocytů směrem k tvorbě kalusu, z kterého se mohou regenerovat haploidy a dihaploidy, ale také k heterozygotním diploidy.



### 3.4 Indukovaná androgeneze

Princip indukované androgeneze neboli pylové embryogeneze *in vitro* je obdobný jako u pylového dimorfizmu *in vivo*. Prostřednictvím klasického šlechtění pro získání homozygotních linií je potřeba provést několik zpětných křížení, což představuje časově velmi náročný proces. Proces indukované androgeneze je poměrně jednoduchý a umožňuje výrazně zkrátit čas

produkce čistých linií haploidů a dihaploidů. Od 70. let se touto tematikou zabývá mnoho výzkumných skupin a v současnosti má tato metoda své místo mezi šlechtitelskými nástroji v zemědělství (Dunwell, 2010; Forster *et al.*, 2007)

V závislosti na dárcovské tkáni a podmínkách indukce se embrya mohou vyvinout buď přímo z jednotlivých buněk, nebo nepřímo přes fázi kalusu. O technice prašníkových kultur lze mluvit v případě, že výchozím materiálem jsou celé prašníky. Jsou-li pro indukci použity přímo mikrospory, mluvíme o pylové kultuře neboli kultuře mikrospor (Datta, 2005).

Technika prašníkových kultur je jednodušší a je využívána u mnohých genotypů (Sopory *et Munshi*, 1996). Princip spočívá v tom, že se sterilně vypreparované celé prašníky pokládají na povrch pevného média nebo plavou na povrchu tekutého média. Dle Heberle-Bors (1985) hraje somatické tkáně prašníku důležitou roli při indukci sporofytického dělení pylu. Působí nejen jako překážka toku živin, ale slouží také jako filtr proti toxickým prvkům. Navíc je tato metoda vhodná pro vyšetřování buněčných, fyziologických, biochemických a molekulárních procesů, které se podílejí na embryogenezi pylu (Nitsch, 1977). Nevýhodou kultivace celých prašníků je možnost vzniku rostliny nejen z mikrospor, ale i ze somatických pletiv, což znamená produkci rostlin různého stupně ploidie.

Technika izolované kultivace mikrospor se provádí odstraněním somatické tkáně prašníků. Vyžaduje lepší vybavení a dovednosti ve srovnání s technikou prašníkových kultur. Výhodou je, že sporofytická pletiva buněčné stěny prašníků nezasahují do procesu a je tedy možné přímo sledovat vývoj embrya (Touraev *et al.*, 1997).

Využití haploidů a dihaploidů jako silného šlechtitelského nástroje vyžaduje dobrou dostupnost spolehlivých protokolů tkáňové kultury, které mohou překonat metodické problémy, jako je malá frekvence indukce embryí, albinismus, regenerace a přežití rostlin. Pro zlepšení účinnosti regenerace v širším rozsahu genotypů Maluszynski *et al.* (2003) zveřejnili podrobný manuál, který popisuje 44 protokolů pro výrobu dihaploidů vztahujících se k nejméně 33 druhům rostlin.

Různé druhy, stejně tak jako různé kultivary v rámci jednoho druhu, vykazují velmi rozmanité požadavky a neexistuje standardní protokol pro tvorbu rostlin prostřednictvím indukované androgeneze. Přesto lze ale říci, že genotyp, fyziologický stav a podmínky růstu dárcovských rostlin, stupeň vývoje pylu, stresové předošetření květních pupenů nebo prašníků a prostředí a podmínky kultivace *in vitro* společně s jejich interakcí jsou faktory, které výrazně ovlivňují reakci prašníků na kultivaci *in vitro* (Datta, 2005; Smykal 2000).

### 3.4.1 Faktory ovlivňující androgenetickou indukci

#### 3.4.1.1 Genotyp

Mezi endogenními faktory ovlivňující androgenetickou indukci hraje hlavní roli genotyp. Opakovaně bylo zjištěno, že různé kultivary v rámci jednoho druhu vykazují různé reakce v prašnickové kultuře.

V rámci modelových druhů Touraev *et al.* (2001) ukázali, že u stejného druhu existují kultivary s vysokou i nulovou odezvou. Příkladem může být práce Bajaj (1990), která uvádí, že indukci 21 kultivarů *Triticum aestivum* byli získáni haploidní jedinci pouze z deseti kultivarů nebo že, produkce haploidů u rýže poddruh *Japonica* je vyšší než u poddruhu *India*. Obdobně, výzkum na různých genotypech citrusů prokázal velké rozdíly v zisku haploidů. Bylo použito 11 různých médií, stejné kultivační podmínky a předošetření na 4 kultivary mandarinek klementinek, 5 citronů, 2 mandarinek, 4 grapefruitu, 4 sladkých a 4 kyselých pomerančů. Výsledkem byl zisk haploidů pouze u jednoho kultivaru mandarinek klementinek a jednoho kultivaru citronu, zatímco u zbylých rostlin nedošlo k žádné odezvě (Germana, 2009).

Tvorba mikrospor schopných podstoupit embryogenezi je řízena interakcemi cytoplazmatických a nukleárních genů a modifikována prostředím (Heberle-Bors, 1985). Petolino *et Thompson* (1987) na kukuřici prokázali, že androgenická kompetence může být děděna, a proto existuje možnost jejího šlechtění.

Foroughi-Wehr *et al.* (1982) rozlišují čtyři nezávisle a odlišně zděděné vlastnosti, jmenovitě tzv. indukci kalusu, stabilizaci kalusu, regeneraci rostliny a tvorbu albínů a zelených rostlin.

#### 3.4.1.2 Fyziologický stav a podmínky růstu dárcovské rostliny

Úspěšná tvorba haploidních rostlin použitím prašnickové/ pylové kultury je podmíněná fyziologickým stavem dárcovských rostlin, který se projevuje stavem tkání prašníku. Ten má přímý vliv na produkci embryogenních pylových zrn (Heberle-Bors 1985).

U mnohých genotypů odezva prašníků byla ovlivněna prostředím. Jako příklad lze uvést lepší odezvu prašníků rostlin pěstovaných v polních podmínkách v porovnání s rostlinami pěstovanými ve skleníku (Vasil, 1980). Dle Sunderlanda (1971) prašníky z květů na začátku kvetení reagovaly na indukci lépe než ty z pozdějšího kvetení. Výsledky vlivu prostředí u tabáku



ukázaly, že jak fotoperiodická, tak i světelná intenzita ovlivňují výtěžek mikrosporogenních embryí a rostlin (Dunwell, 1981).

Frekvence embryogenních pylových zrn se zdá být spojena s fenoménem nedostatku dusíku. To může být zapříčiněno nízkou teplotou nebo podmínkami krátkých dnů. Vliv teploty byl demonstrován studii provedenými na ječmeni, řepce olejné a pšenici. Přestože fyziologický stav dárcovské rostliny může dramaticky ovlivnit reakci prašníků v *in vitro* kultuře, nelze tento parametr standardizovat (Germana, 2009).

### 3.4.1.3 Stádium vývoje pylu

Fáze vývoje pylu silně ovlivňuje úspěšnost prašníkové/pylové kultury. Přejít pylových zrn z gametofytického ke sporofytickému vývoji se liší v závislosti na rostlinných druzích a dochází k němu jen v určitém velmi krátkém časovém úseku. Obecně je to období kolem asymetrické první pylové mitózy, tj. v období mezi etapami jednojaderné a dvoujaderné mikrospory. Poté, co pylová zrna začnou akumulovat škrob, obvykle ztrácejí svou embryogenní schopnost a dostávají se na gametofytickou vývojovou dráhu (Touraev *et al.*, 1997). Výsledky výzkumů na *Brassica napus* a *Nicotiana tabacum* ale ukazují, že využitím stresového faktoru lze u mikrospor některých rostlin zvrátit už probíhající gametofytickou cestu.

Telmer *et al.* (1992) ve své práci uvádějí, že nejlepším stádiem pro indukci *Brassica napus* je období pozdně jednojaderného a raně dvoujaderného stádia pylových zrn. Naproti tomu Binarova *et al.* (1977) zjistili, že využitím stresového faktoru tepla (krátkodobé vystavení rostliny teplotě 41 °C), může dojít k embryogenezi i u pylu v pozdním dvoujaderném stádiu. Výsledky práce Touraev *et al.* (1996) u *Nicotiana tabacum* prokázaly vliv stresového předošetření na přechod mikrospor od běžného gametofytického vývoje k alternativnímu sporofytickému. Zatímco nejlepší odezvy při použití teplotního předošetření bylo dosaženo u raně jednojaderných mikrospor, na ošetření hladověním nejlépe reagovala, pylová zrna ve dvoujaderném stádiu vývoje.

Sopory *et Munshi* (1996) zkoumali vliv stádia mikrospor prašníkové kultury na úroveň ploidie rostliny. Ve své studii zjistili, že rostliny získané z pylu v jednojaderné fázi, byly většinou haploidní, zatímco rostliny s vyšším počtem chromozomů byly produkovány z mikrospor v pozdějších fázích.

Fáze vývoje pylu je obvykle testována na jednom prašníku květního pupenu pomocí acetokarmínové metody (Sharma *et Sharma*, 2014). Pro fluorescenční barvení může být také použita fluorescenční sonda DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol dihydrochlorid). Nicméně, v rámci

jednoho prašníku byla pozorovány různá vývojová stádia mikrospor, stejně tak, jako mezi různými prašníky téhož květu (Vasil, 1980).

#### 3.4.1.4 Stresové předošetření

Izolované a *in vitro* kultivované rostlinné buňky za určitých podmínek mohou regenerovat na embrya a celé rostliny. Konverze diferencovaných rostlinných buněk na nediferencované, totipotentní buňky závisí na mimořádných okolnostech působících na buňky. Spouštěcím faktorem nezbytným pro vyvolání embryogeneze v kultivovaných mikrosporech je stres (Touraev *et al.*, 1997). Na základě studií provedených na různých druzích rostlin bylo pro konverzi mikrospor navrženo několik charakteristických znaků (markerů). Jsou jimi:

- (a) fragmentace vakuoly tvorbou cytoplazmatických řetězců z perinukleární k subkortikální cytoplasmě;
- (b) pohyb jádra do středu mikrospory;
- (c) zvětšení buňky;
- (d) vytvoření nové buněčné stěny pod exinou;
- (e) zmenšení jádérka;
- (f) zhutnění chromatinu;
- (g) výskyt multivezikulárních subjektů, připomínající lysozomy a degenerace plastidů;
- (h) tonoplasty potažené taninem;
- (i) snížení velikosti škrobových zrn;
- (k) žádné výrazné strukturální změny mitochondrií a
- (l) symetrické dělení místo pravidelného asymetrického.

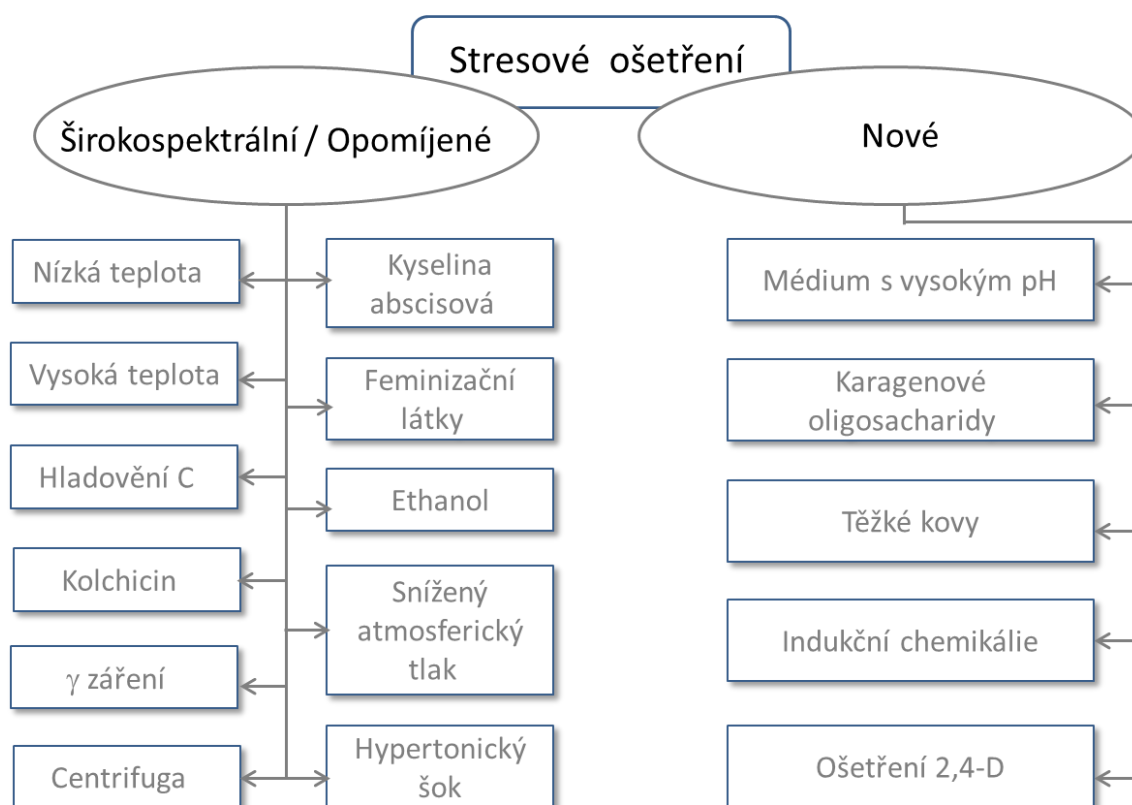
Žádný z nich ale nebyl definován jako univerzální pro všechny druhy rostlin (Touraev *et al.*, 2001).

Po stresovém působení byla pod světelným mikroskopem pozorovaná tzv. „hvězdovitá“ struktura mikrospory. Centralizované jádro obklopené cytoplazmatickými vlákny ve tvaru hvězdy bylo zaznamenáno u embryogenních mikrospor v řadě různých druhů, např. pšenice a tabáku. Navíc další studie používající sledování celého procesu embryogeneze z jednotlivých pšeničných mikrospor objasnilo, že mikrospory s tzv. „hvězdovitou“ vnitřní strukturou a symetrickým buněčným dělením jsou nezbytné pro zahájení embryogenního vývoje izolovaných mikrospor (Touraev *et al.*, 1996b). U jiných druhů se jako sledovaný charakteristický znak používá jen frekvence mikrospor se symetrickým dělením, ačkoli bylo

prokázáno, že mikrospory se dvěma buňkami stejné velikosti se mohou vyvinout gametofyticky (Touraev *et al.*, 1995).

U mnoha genotypů bylo pozorováno, že fyzikální nebo chemické ošetření před kultivací aplikované na květní pupeny, celé květenství nebo vypreparované prašníky působí jako spouštěcí faktor pro vyvolání indukce sporofytické dráhy, čímž se zabrání tvorbě fertilního pylu (Touraev *et al.*, 1997). Stresující činnidla používaná v prašnickové/ pylové kultuře jsou různorodá a mohou být kategorizována různými způsoby, např. v závislosti na době aplikace (před kultivací nebo během ní), dle typu stresu (chlad, teplo, hladovění) apod. Dle práce Shariatpanahi *et al.* (2006) je lze rozdělit do třech skupin – majoritně používaná, minoritně používaná a nová (Obrázek 3).

**Obrázek 3: Schématické znázornění dělení stresujících činnidel** (převzato a upraveno podle Shariatpanahi *et al.*, 2006).



V současné praxi nepoužívanějšími stresory jsou teplotní šok a hladovění, ale různé druhy rostlin mohou vyžadovat rozdílné kombinace ošetření. Nejen správný výběr stresu, ale i výběr správných podmínek v závislosti na určitém stadiu pylových zrn u daného druhu rostlin je pro indukci mikrospor důležitá. Například u tabáku je ošetření tepelným šokem účinné pouze na mikrosporách, nikoliv však na dvoubuněčném pylu (Touraev *et al.*, 1996a).

Tepelný šok je pro indukci pylové embryogeneze považován za nejúčinnější. Optimální teplota a doba působení se však liší podle genotypu rostlin (Bajaj *et al.*, 1977).

Stres ve formě chladového předošetření jako první použil a popsal Nitsch *et Norreel* (1973) u rodu *Datura*. Tento typ předošetření se rutinně používá v prašnickové kultuře mnoha plodin a probíhá při teplotě 4 až 10 °C v rozpětí několika dní až několika týdnů. Bylo zjištěno, že chladové předošetření zpomaluje degradační proces v prašnickových tkáních, čímž chrání mikrospory před toxickými sloučeninami uvolňovanými z rozkládajících se prašníků. Chlad zaručuje přežití většího podílu embryogenních pylových zrn. Také zvyšuje frekvenci endoredukce, která vede ke zvýšení spontánně zdvojených haploidních rostlin. Mikrospory v chladem ošetřených prašnicích se odpojují od tapeta, což vede k hladovění. Zvyšuje se celkový obsah volných aminokyselin, což může vést k adaptaci mikrospor na metabolické změny a indukci embryogeneze. Také jsou exprimovány dva geny pro tvorbu proteinů tepelného šoku (heatshock protein – HSP), které chrání buňky před chladem (Shariatpanahia *et al.*, 2006).

Předošetření vysokou teplotou se obvykle provádí při teplotě 33-37 °C v časovém rozmezí několika hodin do několika dnů. Tepelný šok byl použit jako spouštěč pro vyvolání embryogeneze v izolovaných mikrosporách pšenice a tabáku (Touraev *et al.*, 1996a; Touraev *et al.*, 1996b).

Ukázalo se, že tepelný šok způsobuje změny v mikrotubulech a cytoskeletu u kultivovaných mikrospor *Brassica napus*. V těchto mikrosporách byly zjištěny strukturální změny na rozhraní plazmatické membrány nebo buněčné stěny (Telmer *et al.*, 1992). V teplotně namáhaných mikrosporách bylo syntetizováno několik proteinů tepelného šoku (HSP). Tepelný šok u mikrospor vedl k endoredukci, přičemž G2 haploidní jádra vstoupily do G1 (diploidní) fáze bez mitózy. Navíc u vegetativní buňky došlo k odblokování G1 fáze a vstupu do S fáze (Binarova *et al.*, 1997). Seguí-Simarro *et al.* (2005) doplnili, že během indukované embryogeneze mikrospor se tvořily MAP kinázy.

Kultivace mikrospor v médiu, obsahujícím nemetabolizovatelné zdroje uhlíku (např. mannitol), je účinným induktorem embryogeneze v izolovaných mikrosporách mnoha důležitých plodin, jako je tabák, pšenice a rýže nebo v kultivovaných prašnicích rýže a žita (Shariatpanahi *et al.*, 2006). U „hladovějících“ mikrospor byly pozorovány cytoplazmatické a jaderné změny včetně dediferenciace plastidů, dilatace buněčné stěny, výskytu velké vakuoly, ztráty jaderných pórů ve vegetativním jádru, změn chromatinu a jaderné struktury, fosfolipidového složení plazmalemy a zmenšení jádra. Obdobně jako u tepelného šoku i tady u vegetativní buňky došlo k odblokování G1 fáze. V „hladovějících“ dvoubuněčných pylových zrnech tabáku byl

exprimován gen pro HSP proteiny. Během tohoto typu předošetření (hladovění) byly prokázány kvalitativní a kvantitativní změny v aktivitách proteinkináz (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Dalším spouštěčem stresu je kolchicin, mikrotubulový depolymerizační alkaloid, který narušuje tvorbu mikrotubulů během buněčného dělení a tím zcela brání dělení buněk. Mikrotubuly jsou nezbytné pro tvorbu dělicího vřeténka, které zajistí rozchod chromozómů během anafáze k opačným pólům dělicí se buňky. Selhání mikrotubulové aktivity může vést k endoduplikaci. Reakce mikrospor na kolchicin se zdá být závislá na jejich vývojové fázi. Mikrotubuly jednobuněčných mikrospor jsou mnohem citlivější než dvoubuněčný pyl. Působení kolchicinem na mikrotubuly jednobuněčných mikrospor vede k jejich úplné depolymeraci, zatímco většina mikrotubulů dvoubuněčného pylu není ovlivněna (Zhao *et Simmonds*, 1995). Při depolymeraci mikrotubulů se uvolní jádro zakotvené do buněčné stěny, ztratí se asymetrie mikrospor, jádro migruje do středu buňky a mikrospory podléhají symetrickému dělení (Zhao *et al.*, 1996). Tato změna polaritý buněk může přeprogramovat mikrospory na sporofytickou dráhu. Pozdní jednobuněčné mikrospory, které vstupují do mitózy během počáteční fáze kultivace, můžou účinkům kolchicinu uniknout, rozdělit se asymetricky a pokračovat v normálním vývoji gametofytů. Depolymerizace mikrotubulů kolchicinem je pomalý proces, vyžadující až 8 hodin (Zhao *et Simmonds*, 1995). Výhodou ošetření kolchicinem je i to, že je činidlem, který zdvojnásobuje počet chromozómů. Jednoduchý jednokrokový proces současně vyvolávající embryogenezi a zdvojnásobení chromozómů je výhodný jak pro genetické studie, tak i programy šlechtění rozmnožování rostlin. Ošetření kolchicinem se využívá u pšenice, řepky, kukuřice, cukrové řepy, čiroku, pšenice, rýže a kávy (Germana, 2011; Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Centrifugace a působení sníženého atmosférického tlakum nebo vodního stresu patří do skupiny méně používaných stresových předošetření pro prašnickové kultury. Mechanismus toho, jak stres ovlivňuje diferenciaci pylu, dosud nebyl pevně stanoven. Přesto se zdá, že tato stresová předošetření způsobují změnu polaritý rozdělení při první haploidní mitóze, zahrnující reorganizaci cytoskeletu, zpoždění a modifikaci pylové mikrospory, blokování produkce nebo rozpouštění mikrotubulů (Nitsch, 1977).

Dalšími příklady minoritně využívaných a nových stresových předošetření může být kyselina abscisová u prašnickové kultury tabáku a ječmene, feminizační činidla u tabáku, ethanol u řepky, hypertonický šok u pšenice a záření  $\gamma$  v prašnickových kulturách řepky, tabáku a rajčete. O rozšíření používání těchto stresorů u jiných druhů není k dispozici mnoho informací, pravděpodobně i proto, že použití majoritních stresorů je snadnější. Avšak i tyto specifické stresory se mohou ukázat jako účinné při vyvolání embryogeneze mikrospor u druhů, kde použití majoritních stresorů nebylo úspěšné (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Volba stresu závisí nejen na jeho efektivitě při tvorbě embryogenních mikrospor, ale i celkové funkčnosti a praktičnosti. Pokud by například ošetření chladem bylo stejně účinné jako předběžné ošetření kolchicinem nebo zářením  $\gamma$ , bude preferováno klasické ošetření chladem, protože ostatní postupy budou vyžadovat zvláštní manipulaci a technické prostředky.

Nelze jednoznačně říci, která vlastnost mikrospor může být definována jako univerzální sledovaný znak embryogenního stavu. Mikrospory hvězdovitého tvaru se zdají být embryogenní u pšenice, tabáku, jablek a rýže. Naproti tomu u *B. napus* lze pozorovat zvětšení buněk a symetrické dělení. Ukázalo se také, že v závislosti na druhu stresu se v embryogenních mikrosporách ječmene objevuje jak symetrické, tak asymetrické první mitotické dělení buněk (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Mechanismus působení stresu v kontextu přeprogramování mikrospor stále nebyl přesně objasněn. Zatímco projevy účinku tepla a hladovění jsou si ve svém stresovém působení na embryogenezi mikrospor v širokém rozmezí různých druhů podobné, chlad nemůže být skutečně považován za stresový, ale za antistresový faktor. Chlad udržuje u všech rostlin životaschopnost buněk při přeprogramování, zatímco spouštěčem stresu je hladovění. U použití kolchicinu a většiny dalších minoritně používaných a nových stresorů postrádáme informace o jejich obecném významu v embryogenezi mikrospor a jejich stresovém účinku.

Posledním problémem je porozumění genové expresi během indukce embryogeneze mikrospor. Geny exprimované během embryogenní indukce mikrospor jsou podrobně studovány, ale přesto dosud nebylo jednoznačně potvrzeno, že tyto geny jsou skutečně specifické pro embryogenní mikrospory, nebo že jsou nezbytné pro přeprogramování drah mikrospor (Maraschin *et al.*, 2005).

Na rozdíl od stresu se zdá, že hormony jsou pro úspěšnou indukci méně důležité. Podle Aionesei *et al.* (2005) poměrně nízká důležitost hormonů v embryogenezi mikrospor závisí na skutečnosti, že hormonální autotrofie je podmínkou *sine qua non* pro pravou embryogenezi.

### **3.4.1.5 Povrchová sterilizace pupat a preparace prašníků**

Povrchová sterilizace pupat je nezbytným krokem přípravy květních pupat, ze kterých jsou dále extrahovány prašníky. Povrchová sterilizace vede k odstranění kontaminantů, nejčastěji bakterií a hub z povrchu připravovaných pupat. Většina používaných sterilizačních protokolů se nachází v manuálu pro produkci haploidů od Maluszynski *et al.* (2003).

Poupata většiny rostlin jsou nejprve ponořena na několik minut do 70% roztoku ethanolu a poté na 10 až 15 minut do roztoku chlornanu sodného (1,5% aktivního chloru ve vodě),

obsahujícího několik kapek detergentu Tween 20. Nakonec jsou poupata nejméně třikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou již v aseptickém prostředí. V posledním kroku jsou prašníky z poupat asepticky vyříznuty a umístěny na médium. Při preparaci prašníků by nemělo dojít k poranění, aby se zabránilo produkci somatického kalusu z tkání stěny prašníku (Reinert *et* Bajaj, 1977).

### 3.4.1.6 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.*, 1998).

#### 3.4.1.6.1 Fyzikální podmínky

Prašníkové kultury jsou obvykle indukovány při teplotě 24-27 °C a vystaveny působení světla při intenzitě asi 2 000 lx/m<sup>2</sup> po dobu 14 - 24 hodin (Reinert *et* Bajaj, 1977) Jiné kultivační podmínky uvádí Vasil (1980) a to střídání světla (12-18 h, 5000 - 10 000 lx/m<sup>2</sup>) s teplotou 28 °C a tmy (12-6 h) s teplotou 22 °C.

Optimální podmínky se musí stanovit pro každý jednotlivý systém. Světlo je signál prostředí, který reguluje morfogenezi pylu *in vitro*. Vysoká intenzita bílého světla působí u prašnickových kultur inhibičně, zatímco tma nebo nízká intenzita bílého světla jsou méně inhibiční (Nitsch, 1981; Wenzel *et* Foroughi-Wehr, 1984). Indukce prašníků v nepřetržité tmě byla příležitostně považována za zásadní. Střídání světla a tmy je po indukční době vhodné pro kultivaci několika druhů: *Hyoscyamus niger*, *Datura innoxia* a *Nicotiana tabacum* (Sunderland, 1971).

Pro úspěšnou indukci prašnickových kultur je důležitá i hustota kultury (tj. počet prašníků v kultivační nádobě na jednotku plochy nebo objem média) a způsob umístění explantátu na médiu (Sopory *et* Munshi, 1996).

### 3.4.1.6.2 Chemické podmínky kultivace – kultivační média

Požadavky na složení kultivačních médií jsou pro různé genotypy různé, přičemž požadavky na výživu extrahovaných prašníků jsou mnohem jednodušší než požadavky na výživu izolovaných mikrospor (Bajaj, 1990).

Pro prašnickovou kulturu se nejčastěji používají bazální média N6 (Chu, 1978), MS (Murashige *et* Skoog, 1962), Nitsch *et* Nitsch, (1969) a B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Pro čeled' *Solanaceae* jsou to obvykle polopevná média na bázi směsi solí MS. Pro produkci embryí je nezbytný zdroj sacharidů, hlavně kvůli jejich osmotickým a výživovým účinkům (Powell, 1990).

Vliv koncentrace sacharidů pravděpodobně souvisí s regulací osmotického tlaku během indukční fáze (Sunderland, 1971). Keller *et al.* (1978) ve své práci uvádí, že vysoké koncentrace zdroje uhlíku mohou být škodlivé později v období kultivace. Hlavní sacharid v rostlinné tkáni je sacharóza. Proto je i nejběžnějším zdrojem uhlíku používaným v prašnickové kultuře. V médiu je obvykle ve 2 - 4% koncentraci (Reinert *et* Bajaj, 1977). U některých druhů, např. Brassicaceae a Poaceae se vyžaduje vysoká koncentrace sacharózy (6-17 %), protože jejich zralý pyl je trojbuněčný. Naproti tomu u rostlin, u kterých je zralý pyl dvoujaderný, např. druhu *Solanaceae*, je nejvhodnější koncentrace sacharózy 2-5 % (Dunwell, 2010). V prašnickové kultuře ječmene lze sacharózu úspěšně nahradit maltózou obvykle v množství  $62 \text{ g.l}^{-1}$  v indukčním médiu a v poloviční koncentraci v regeneračním médiu. Maltóza může být také použita u pšenice, tritikále, žita a rýže v množství 60 až  $90 \text{ g.l}^{-1}$  (Wedzony *et al.*, 2009).

V prašnickové kultuře byly podrobně zkoumány účinky regulátorů růstu rostlin. Ačkoli několik modelových druhů, např. většina druhů *Solanaceae* nevyžaduje přidání auxinu do indukčního média, pro produkci embryí pocházejících z mikrospor je přítomnost regulátorů růstu rozhodující pro většinu rostlinných druhů, zvláště pro rekalitrantní rostliny (Maheshwari *et al.*, 1982).

Dráhu vývoje mikrospor určuje typ a koncentrace auxinů. Pro indukci kalusů je vhodná kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) a kyselina indol-3-pyruvátová (IAA), zatímco kyselina naftalenocetová (NAA) podporuje přímou embryogenezi (Armstrong *et al.*, 1987).

Přidání aktivního uhlí (v množství  $0,5-2 \text{ g.l}^{-1}$ ) zvyšuje účinnost embryogeneze mikrospor u několika druhů. Příkladem může být zvýšení odezvy tabákových prašníků doplněním bazálního média přísadkou 2% aktivního uhlí. Zdá se, že aktivní uhlí pomáhá odstranit inhibiční látky z média a pravděpodobně i ze stěn prašníku a reguluje úroveň endogenních a exogenních regulátorů růstu (Vasil, 1980; Heberle-Bors, 1985). U některých genotypů je přidání antioxidantů a aktivního uhlí užitečné i tím, že snižuje zčernání tkání způsobené fenoly.



Dalším faktorem, který může ovlivnit proces embryogeneze je pH (Stuart *et al.*, 1987). pH médií pro prašnickovou kulturu se obvykle upravuje na 5,7 - 5,8 před sterilizací vodní párou. Jako tuhnoucí složka se do tuhých kultivačních médií zpravidla přidává agar, ale může to být i škrob (bramborový, pšeničný, kukuřičný nebo škrob z ječmene) nebo agaróza (Dunwell, 2010).

### **3.4.1.7 Morfogenní vývoj, přeprogramování genové exprese a regenerace rostlin**

Po stresovém předošetření a během kultivace můžou mikrospory následovat různé vývojové dráhy. Mnoho mikrospor okamžitě zastaví svůj vývoj a/ nebo zemře. Některé z nich pokračují ve vývoji až do dospělého stádia pylového zrna a pak zastaví svůj vývoj a zemřou. Jiné mikrospory jsou stresovým předošetřením účinně indukované a vytvoří mnohobuněčný kalus nebo embryo (MDE, z angl. Microspore-Derived Embryo). U těchto mikrospor dochází ke změnám na různých úrovních, od buněčné architektury až po genovou expresi. Mezi rozsáhlé změny patří přemístění jader do centra buněk, přestavba jaderných a cytoskeletálních prvků a rozpad velké centrální vakuoly (Seguí-Simarro *et Nuez*, 2008a).

Změny genové exprese mohou být seskupeny do tří hlavních kategorií

- buněčná odpověď na stres,
- potlačení gametofytického programu a
- exprese embryogenního programu.

Se spouštěním každé z těchto fází přímo nebo nepřímo souvisí počet exprimovaných genů, produkovaných proteinů a metabolitů, které jsou předmětem výzkumu u důležitých plodin, jako je pšenice, ječmen a tabák (Maraschin *et al.*, 2005)

Pro vyvolání odezvy na stresový signál musí být tento signál nejprve přijat. Jako příjemce extracelulárních stresových signálů se obvykle uvádí kyselina abscisová (Seguí-Simarro *et Nuez*, 2008a). V souvislosti s buněčnou odezvou na stres byly popsány změny v hladinách různých proteinů tepelného šoku poté, co rostliny byly vystaveny stresu z chladu, tepla, kolchicinu nebo hladovění (Smykal, 2000). V současné době se předpokládá, že tyto proteiny mají ochrannou úlohu související se stresovou tolerancí (Seguí-Simarro *et Nuez*, 2008a). Zvýšená exprese genů katalázy a glutathion-transferázy se vysvětluje jako ochranná odezva proti oxidativnímu stresu vyvolanému *in vitro* kultivačními podmínkami.

Před spuštěním embryogenního programu, musí buňka zrušit gametofytický program. Klíčovým bodem tohoto procesu je blokáce syntézy škrobu (znak dozrávání pylu) a odstranění zásob škrobu. Na indukovaných mikrosporách ječmene byla pozorována exprese genů podílejících se na biosyntéze a akumulaci škrobu spolu s indukcí genů pro rozpad škrobu

a sacharózy. Souběžně se zdá, že určitý druh dediferenciačního programu funguje za účelem odstranění molekul souvisejících s mikrogametogenezí z cytoplazmy (Maraschin *et al.*, 2005).

První indikace pro nástup embryogenního programu je symetrické rozdělení mikrospor, které je u většiny androgenních systémů následováno nepřetržitým proliferačním dělením, což vede k tvorbě nediferencovanému kalusu. Od této fáze se embryo (MDE) postupně přibližuje morfologii svého zygotického protějšku. Regulátory růstu, jako je ethylen, IAA nebo ABA, jsou důležité pro určité aspekty vývoje MDE, stejně jako u zygotických embryí. Nicméně časové profily nebo absolutní hladiny těchto rostlinných hormonů se od zygotické embryogeneze liší. Tyto rozdíly lze připsat absenci endospermu jako zdroje regulačních podnětů (Seguí-Simarro *et Nuez*, 2008a).

Absence regulačních podnětů pocházejících z endospermu nebo jiných semenných tkání může být také pozorovaná u některých druhů tvorbou kalusů obsahujících nediferencované struktury, které se tvoří během kultivace prašníků *in vitro*. Z těchto kalusů jsou pak regenerovány haploidní a dihaploidní rostliny. Tato pozorování vedla k hypotéze, že proliferace kalusů není alternativou pro vývoj a regeneraci haploidů závisící na genotypu rostlin, ale důsledkem neoptimálních experimentálních podmínek, které vylučují, aby se embryo vyvíjelo správným způsobem. Je tedy pravděpodobné, že u většiny druhů tvořících kalus odvozený z mikrospor, by produkce embryí byla možná, jakmile by byly známy konkrétní podmínky pro vývoj embryí. Svědčí o tom některé druhy zemědělských plodin jako je ječmen, pšenice nebo rýže (Bouharmont, 1977; Gonzalez Medina *et Bouharmont*, 1978).

### 3.4.1.8 Charakterizace zregenerovaných rostlin

#### 3.4.1.8.1 Analýza ploidie

Produkty *in vitro* kultur nejsou jen haploidy nebo dihaploidy. Z prašnickové kultury různých genotypů mohou být získány haploidní nebo nehaploidní (diploidní, triploidní, tetraploidní, pentaploidní, hexaploidní) embrya a rostliny (Dunwell, 2010).

Pro detekci ploidie u rostlin získaných indukovanou androgenezí lze použít metody přímé (počítání chromozomů) nebo metody nepřímé (průtoková cytometrie, počet chloroplastů ve svěřacích buňkách průduchů a morfologická pozorování). Každá z těchto metod má výhody i nevýhody. Počítání počtu chromozomů z buněk kořenových špiček regenerovaných embryí nebo z rostlin je spolehlivou, ale časově velmi náročnou a poměrně těžkopádnou metodou. Metody založené na počítání chloroplastů ve svěřacích buňkách průduchů patří k metodám nepříliš pracným a lehce proveditelným, ale nemusí být vždy spolehlivé (Sari *et al.* 1999).

#### 3.4.1.8.2 Průtoková cytometrie

Nejrozšířenější a také nejspolehlivější metodou používané pro stanovení ploidního stupně je průtoková cytometrie. Tato moderní a perspektivní metoda je v současnosti používána v základním i aplikovaném výzkumu mnoha biologických oborů (Bohanec, 2009). Hlavním principem této metody je vytřídění buněk splňujících určité parametry z heterogenní populace buněk. Pro označení specifických parametrů buněk se nejčastěji používají fluorescenční sondy.

Postup cytometrických analýz je jednoduchý. Na dvoušroubovici DNA studovaného vzorku se před samotným měřením naváže fluorescenční barvivo (fluorochrom). Podmínkou je nutnost obarvit pouze DNA nacházející se v jádře buňky. Při procesu barvení tedy nesmí dojít k obarvení žádných dalších organel studovaných buněk. Po ozáření fluorescenčního barviva světlem vhodné vlnové délky (excitační záření), dojde k absorpci excitačního světla fluorochromem a excitaci elektronů. Excitované elektrony se vzápětí vrací do základního stavu, při čemž uvolňují světelnou energii (emisní záření). Emisní záření má vyšší vlnovou délku a nižší energii než excitační záření. Vhodně zvolenými optickými filtry lze obě záření oddělit a měřit jejich intenzitu.

Základní součásti cytometru jsou: průtoková komůrka, zdroj excitačního záření, optická soustava, soubor fotonásobičů a zesilovačů a vyhodnocovací část (počítač).

Hlavní výhodou průtokové cytometrie je rychlost a spolehlivost. Nevýhodou je nutná kalibrace pro konkrétní potřebu. Navíc je nutné empiricky odstranit slabé fluorescenční signály, aby se zabránilo šumu při zobrazení (Doležel *et al.*, 2007).

### 3.4.1.8.3 Detekce homozygotnosti

Nehaploidy mohou pocházet ze somatické tkáně stěn prašníků, z fúze jader, z endomitózy v zrnu pylů, z nepravidelných mikrospor tvořených meiotickými nepravidelnostmi (Sunderland *et Dunwell*, 1977) a v některých případech se zdá, že původ nehaploidů pochází z neúplné tvorby buněčných stěn mezi vegetativním a generativním jádrem.

Duplikace haploidního genomu jedinců pocházejících z pylu probíhá prostřednictvím tří mechanismů, endoreduplikace, jaderné fúze a mitózy, ke které dochází po aplikaci kolchicinu. Diploidní nebo polyploidní rostliny pocházející z tohoto způsobu ošetření jsou zcela homozygotní. Vzhledem k tomu, že jak kalus, tak i rostliny vzniklé použitím prašnickové metody mohou být nejen homozygotní ale i heterozygotní, pro detekci homozygotnosti lze použít metodu SSR (z angl. Single Sequence Repeats) markerů (Chani *et al.*, 2000).

### 3.4.2 Androgeneze brambor

Hlavní kulturní druh brambor, *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* je autotetraploid ( $2n = 4x = 48$ ). Existuje více než 200 druhů nekulturních brambor a mnoho z nich je diploidních ( $2n = 2x = 24$ ). Tyto druhy nelze snadno křížit s tetraploidními kulturními druhy, vzhledem k rozdílným hladinám ploidie. Další hybridizační bariérou je neslučitelnost v EBN. Obě tyto bariéry však mohou být částečně překonány indukci haploidních linií.

Brambory patří k prvním plodinám, u kterých byly použity haploidní techniky šlechtění. Chase (1963) navrhl křížení čtyř různých dihaploidních rodičů, aby získal dva různé diploidní hybridy, které by pak mohly být kříženy a polyploidizovány, aby vytvořily tetraploidní brambory s genomy čtyř různých rodičů.

Obecně lze dihaploidní linie ( $2n = 2x$ ) produkovat opylením kulturních brambor specifickým diploidním druhem *S. phureja* nebo alternativně inertní kulturou *in vitro*. Specifitu *S. phureja* pro indukci partenogeneze u kulturních brambor prvně zmiňuje van Breukelen *et al.* (1975). Autoři navíc využili antokyanové zbarvení hlíz a rostlin jako genetického markeru pro selekci homozygotních bramborových klonů.

Ke konci padesátých let se začaly používat nové metody pro získání dihaploidů/haploidů, jako je prašnicková nebo pylová kultura a somatická hybridizace. Zatímco dihaploid je

získán z tetraploidu, haploid může být získán z diploidních rostlin nebo z tetraploidních rostlin realizací dvou po sobě jdoucích cyklů snižování počtu chromozomů. Zdvojení chromozomů haploidů/ dihaploidů vede k produkci homozygotních diploidů/ tetraploidů. I když druhy rodu *Solanum* patří v porovnání s jinými zemědělskými plodinami spíše k rekalcitrantním rostlinám, v roce 1972 Irikura *et* Sakaguchi popsali produkci haploidní rostliny pocházející z prašníků nekulturních druhů *Solanum verrucosum*. Kohlenbach *et* Geier (1972) zase byli první, kteří získali embrya z kalusů kultivací prašníků kulturních brambor, u nichž se ale nepodařilo realizovat organogenezi. To se později podařilo týmu Dunwella *et* Sunderlanda (1973) získáním haploidních rostlin z prašnickové kultury kultivaru *Pentland Crown*. Použití techniky izolovaných mikrospor pro indukci haploidů nebylo úspěšné (Sopory, 1977b). Navzdory těmto raným pracem byl vývoj haploidů v prostředí *in vitro* u komerčních odrůd brambor omezen. Průlom nastal až v roce 1996 ve Finsku, když se podařilo zvýšit produkci regenerantů tetraploidních kulturních brambor prostřednictvím gametické embryogeneze (Rokka, 2003).

V prašnickové kultuře může být vývoj rostlin z mikrospor iniciován z vegetativních buněk, generativních buněk nebo jejich fúzovaných buněk. Kultivační odpověď prašnickové kultury je řízena geneticky i environmentálně. K nejdůležitějším faktorům patří původ dárcovských rostlin, vývojové stádium pylu, stresové předošetření a kultivační podmínky (Sopory *et* Bajaj, 1987).

### 3.4.2.1 Vliv genotypu

Indukovanou embryogenezi metodou prašnickové kultury v roce 1973 Dunwell *et* Sunderland realizovali na třech kultivarech *Solanum tuberosum*; *Pentland Crown*, *Maris Piper* a *Record*. Prašníky byly kultivovány ve stádiích meiózy, mikrospor a mladých pylových zrn. Vyšší tvorba embryí byla pozorována z prašníků sbíraných v létě než těch, která byla sbíraná na jaře. Tato skutečnost pravděpodobně souvisela s lepším zdravotním stavem letních rostlin. K tvorbě embryí i kalusů, ze kterých zregenerovaly rostliny, došlo pouze u kultivaru *Pentland Crown*.

V roce 1975 Irikura kultivoval prašníky 118 klonů 46 druhů *Solanum* a byl úspěšný u 11 druhů. Haploidní rostliny získal ze *S. verrucosum*, *S. bulbocastanum*, *S. phureja*, *S. stenotomum* a dvou mezidruhových hybridů.

Sopory *et* Rogan (1976) kultivovali prašníky různých dihaploidních klonů *S. tuberosum* a zjistili, že ke tvorbě embryí a kalusů došlo u pěti klonů, přičemž tři klony vznikly křížením stejných rodičů. Poté, co byly testovány i další klony tohoto křížení a pozitivní odezva na indukci prašníků byla zaznamenána pouze u některých, autoři došli k závěru, že řízeným

křížením a selekcí lze získat vhodné genotypy pro indukovanou androgenezi. Na základě výsledků této práce se o dva roky později Sopory *et al.* (1978) podařilo získat genotyp, který produkoval velký počet haploidních embryí, ze kterých byly vypěstovány kompletní rostliny. Použitím tohoto genotypu byly získány tisíce rostlin, které vykazovaly vynikající androgenní účinnost, která byla přenesena do dalších generací (Uhrig, 1985).

Vliv genotypu na tvorbu kalusu potvrdili i Sopory (1977a) a Sopory *et Tan* (1979). Jeden z klonů, které byly studovány, vykazoval velmi vysokou frekvenci tvorbu kalusů, které ale byly cytologicky nestabilní. Počet chromozomů zregenerovaných rostlin byl 12, 24, 36, 48 a některé rostliny byly aneuploidní. Bylo tedy zřejmé, že pro získání haploidních stabilních rostlin by byla vhodnější přímá tvorba embryí než regenerace rostlin z kalusů. Vliv genotypu ovlivnil i to, ze kterých částí prašníku se bude kalus tvořit, jestli z pylových zrn nebo ze stěn (Sopory *et Tan*, 1979).

Studie Smykala (2000) prokázala, že schopnost podstupovat embryogenezi mikrospor je dědičně recesivní znak řízený více než jedním genem a že různé vývojové stavy při produkci embryí a regeneraci rostlin jsou nezávisle geneticky kontrolovány.

### **3.4.2.2 Vliv vývojového stádia pylu**

Dunwell *et Sunderland* (1973) zjistili, že nejlepší období pro indukci prašníků brambor je období, ve kterém se pyl chystal vstoupit do mitózy, zatímco u tabáku je to období hned po první mitóze. Také průběh počtu odezev v korelaci se stářím prašníků se lišil. Pokles odezev u tabáku byl pozvolný, ale u brambor klesl prudce. V prašnicích studovaných kultivarů, které byly ve stádiu mikrospor, došlo k tvorbě embryí i kalusů. V žádném prašníku ve stádiu meiózy k embryogenezi nedošlo.

Prašníky kultivovaných dihaploidních klonů *S. tuberosum*, u kterých došlo k dělení pylu a tvorbě embryí, byly ve fázi jednojaderného pylového zrna (Sopory *et Rogan*, 1976).

Sopory *et al* (1978) zjistili, že prašníky, obsahující pyl v jednojaderné fázi, byly nejvíce citlivé při produkci embryí. Pyl se začal dělit po 4 až 5 dnech a vzniklá embrya se vyvinula do rostlin. Při kultivaci prašníků, ve kterých byla pylová zrna ve dvoujaderném stádiu, se odezva snížila.

Sunderland *et Evans* (1980) dospěli ke stejným závěrům. Navíc uvedli, že v prašnickové kultuře může být vývoj rostlin z mikrospor iniciován z buněk vegetativních, generativních nebo buněk, které jsou výsledkem jejich fúze.

Neexistuje jednoznačná odpověď na otázku, proč nejlepší odezva prašnickové kultury je u jednojaderného pylu. Důvodem může být skutečnost, že mikrospora ještě není úplně diferenciovaná, ale je v procesu dělení a aby se stala diferencovanou buňkou (tj. buňkou s naakumulovaným škrobem) je stále metabolicky aktivní. Když pylové zrno v tomto stádiu dostane potřebný impuls, může se cesta vedoucí k diferenciaci na vegetativní a generativní buňku obrátit. Dochází k dělení nediferencovaných buněk, ze kterých se nakonec diferencuje embryo. Podněty mohou mít fyzikální nebo chemický charakter (Bajaj, 1990).

Bylo zjištěno, že délka květních pupat brambor koreluje s vývojovým stádiem pylu (Preťová, 1995). Rokka (2003) sklízel pupata z genotypů *S. tuberosum*, když jejich délka byla 4 až 6 mm. Prašníky těchto pupat měřily 3-4 mm. Okvětní lístky nebyly ve většině genotypů viditelné nebo jen málo viditelné. U některých genotypů, jako je *Solanum tuberosum* odrůdy "Torrison" byl pomalejší vývoj prašníků, proto délka pupat musela být větší. Naproti tomu délka pupat *Solanum acaule* použitých pro prašnickovou kulturu byla 3-4 mm. Délka pupat u rostlinného materiálu (tetraploidy cv. *Borka* a diploidní klon 8294/24 pocházející z Institutu výzkumu brambor Havlíčkův Brod v České republice a diploid 390541/4 pocházející z Mezinárodního střediska brambor v Limě v Peru) ve výzkumu Říhová et Tupý (1999) byla 4,5-5 mm. Ve všech případech se vývojová fáze mikrospor stanovovala acetokarmínovou metodou.

### 3.4.2.3 Vliv stresového předošetření

Stres je považován za hlavního spouštěče vyvolání embryogeneze v podmínkách *in vitro* (Touraev *et al.*, 1997). U brambor se obvykle využívá předošetření chladem, případně hladověním. Chladové předošetření, tj. uchování pupat v navlhčených ubrouscích při teplotě 4-6 °C po dobu 72 hodin, použili ve svých pracích Aziz *et al.* (1999) a Tepakum *et al.* (1998). Preťová (2005), kombinovala předošetření chladem s hladověním, aby stimulovala indukci prašníků u dvou genotypů, jednoho dihaploidního a jednoho tetraploidního. Chani *et al.* (2000) zvýšil výtěžnost embryí o 40 % tím, že pupata vystavil tepelnému šoku 35 °C po dobu 12 hodin. Na druhou stranu tepelný šok snížil rychlost regenerace rostlin.

### 3.4.2.4 Vliv fyzikálních a chemických faktorů

Na produkci dihaploidních a haploidních embryí v prostředí *in vitro* použitím prašnickových kultur mají vliv různé faktory. Pro kultivaci třech kultivarů *Solanum tuberosum* v práci Dunwella et Sunderlanda (1973) byla použita jako základní média použitá v pracích Guha

*et Maheshwari (1967) a Murashige et Skoog (1962), Blaydes (1966), Bourgin et Nitsch (1967), Schenk et Hildebrandt (1972) a White (1963).* Jako tuhnutí složka byl použit agar. Některá média byla použita bez přítomnosti rostlinných regulátorů růstů, některá byla obohacena o kombinace kinetinu a auxinu v různých koncentracích. V některých případech byla použita zvýšená koncentrace sacharózy až na 20 %, v jiných bylo přidáno kokosové mléko místo nebo spolu s kinetinem. Složení médií ovlivnilo počet, velikost, texturu i barvu vzniklého kalusu.

Foroughi-Wehr *et al.* (1977) kultivovali prašníky na Linsmaierově *et Skoogově* (1965) médiu s modifikací, kde  $\text{CoCl}_2$  a  $\text{FeSO}_4$  byly vynechány a místo toho byl přidán FeNaEDTA. Autoři používali šest různých médií, s různou koncentrací auxinů a cytokininů. Pro vyvolání dělení pylů byla nejlepší kombinace hormonů kyseliny indolactové (IAA) a benzylainopurinu (BA). V médiích s IAA a BA se tvořily výhonky, v médiích s kyselinou naftalenoctovou (NAA) a kinetinem došlo pouze k tvorbě kořenů.

Sopory *et al.* (1978) při kultivaci prašníků 40 genotypů brambor otestovali více než 100 kombinací médií. Základ tvořilo médium MS (Murashige *et Skoog*, 1962). Maximální odezva byla dosažena při přidání sacharózy v koncentraci  $60 \text{ g.l}^{-1}$  spolu s  $6 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  IAA a  $4 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  BA a aktivním uhlím. Výměnou BA za kinetin či zeatin nebo nahrazením IAA pomocí 2,4-D a NAA se snížila odezva prašníků dihaploidních brambor. Pro diferenciaci pylového kalusu byl však nejlepší zeatin ribosid. Nejvyšší produkce kalusu u 13 kultivarů autotetraploidních brambor bylo získáno použitím  $0,1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  zeatinu a  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D (Mix, 1983). Vzhledem k tomu, že lze vytvořit neomezené množství kombinací médií, je obtížné kategorizovat některé rostliny jako kalcitranční.

Přesná role sacharózy při indukci diferenciaci není jasná, ale působí více než jen jako zdroj sacharidů. Tento neznámý efekt nemohl být nahrazen použitím glukózy ani manitolu (Sopory, 1979). V případě, že koncentrace sacharózy byla 2 %, nedošlo k žádné odezvě, prašníky reagovaly pouze, když byla koncentrace sacharózy alespoň 4 %. Stejně výsledky byly publikovány i Foroughi-Wehrem *et al.* (1977).

Přídavek aktivního uhlí do média měl také pozitivní efekt na indukci embryí u brambor (Sopory *et al.*, 1978). Aktivní uhlí pravděpodobně ovlivňuje absorpci inhibičních sloučenin z agaru (Johansson *et al.*, 1982).

Použitím bramborového extraktu (extrakt byl připraven vařením brambor ve vodě a přefiltrován) spolu s hormony a sacharózou (alespoň 2 %) se zvýšilo procento prašníků produkujících embrya (Sopory, 1979). Bramborový extrakt obsahuje glutathion koenzym glyoxalázy regulující buněčné dělení společně se svým substrátem methylglyoxalem (Ramaswamy *et al.*, 1984).



Uhrig (1985) zjistil, že kapalně médium ve srovnání s pevným agarovým médiem může výrazně zlepšit výnos embryí.

Neexistuje jednotný názor na to, jestli je pro indukci prašníků prospěšnější jejich kultivace ve tmě nebo při střídání světla a tmy. Foroughi-Wehr *et al.* (1977) kultivovali prašníky ve tmě při teplotě 23 °C a přenesli je na světlo až po začátku diferenciaci. Naproti tomu Sopory *et al.* (1978) při kultivaci prašníků ve tmě nezískal žádnou odezvu. Pro indukci bylo optimální střídání světla a tmy ve 12 hodinových intervalech. Uhrig (1985) pro získání embryí kultivoval prašníky ve tmě při teplotě 25 °C po dobu 5-8 týdnů.

### 3.4.2.5 Pylová kultura

Ačkoli u většiny druhů brambor lze haploidy produkovat prašnickovou kulturou, čím dál častěji se pro získání haploidů využívá kultivace izolovaných pylových zrn. Při srovnání odezvy při použití prašnickové a pylové kultury bylo zjištěno, že pro některé klony je vhodnější prašnicková a pro některé pylová kultura. U některých druhů rekalcitrantních se podařilo získat embrya právě jen použitím pylové techniky. Bylo ale také zjištěno, že u respondujících klonů došlo k dělení pylových zrn i u prašnickových kultur. Vliv stěny prašníků na zahájení dělení pylů není ještě úplně znám (Sopory *et Bajaj*, 1987).

### 3.4.2.6 Využití techniky prašnickových kultur a haploidů

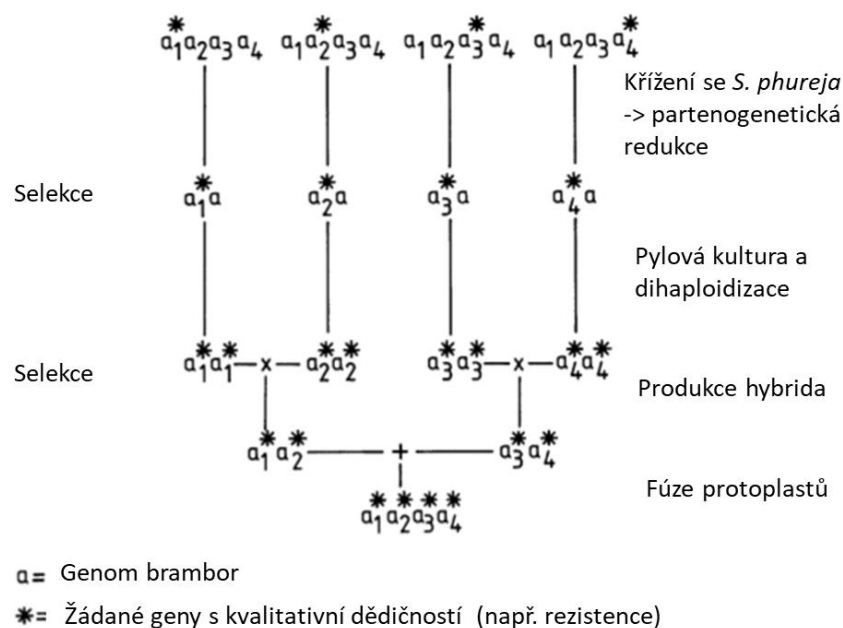
Získání čistých linií procesem samoopylování trvá 6 až 8 let. Naproti tomu použití techniky prašnickových kultur může tento proces zkrátit na 6 měsíců. Díky ní lze produkovat haploidy, jejichž diploidizací vznikají homozygotní čisté linie. Kromě toho mohou být v generaci F1 vybrány nové kombinace znaků, které lze v procesu klasického šlechtění detekovat až v generaci F2 nebo F3. Použití haploidů bylo zdůrazněno v řadě souhrnných publikací (Sopory, 1979; Bajaj, 1990).

Kulturní druhy brambor jsou z pravidla tetraploidní. Dihaploidy a haploidy mohou být získány partenogeneticky nebo prašnickovou/ pylovou kulturou. Dihaploidy/ haploidy produkované těmito metodami lze využít v hybridizacích pro rozšíření genofondu brambor a ke zvýšení genetické diverzity z hlediska přenosu cenných znaků, např. geny rezistence k nemocem. Jsou také vynikajícím nástrojem pro genetické studie, jako je analýza polyploidního stavu druhů *Solanum* a jejich mezidruhových hybridů a pro analýzu genetického základu vlastností (Gavrilenko *et al.*, 2001). V neposlední řadě mohou být použity i pro genetické mapování a identifikaci genů, které kontrolují rezistenci vůči chorobám nebo škůdcům (Song *et al.*, 2005).

Brambor patří k rostlinám, u kterých je možná kultivace a regenerace protoplastů, které lze použít v metodách parasexuálního rozmnožování, jako je např. fúze protoplastů. Wenzel *et al.* (1979) navrhli schéma pro získání brambor s požadovanými vlastnostmi využitím kombinace technik klasického šlechtění a tkáňových kultur (Obrázek 4).

Schéma znázorňuje redukci úrovně ploidie tetraploidního bramboru na dihaploidní alespoň u čtyř klonů, přičemž každý klon má nějaký požadovaný, kvalitativní dědičný znak. Může to být např. odolnost vůči chorobám. Diploidizací vybraných diploidů s požadovanými znaky lze získat homozygotní rostliny. Jsou-li rostliny samosprašné, mohou se homozygotní linie rozmnožovat pomocí semen, čímž lze zabránit přenosu virů na rozdíl od vegetativního rozmnožování hlízami. Vzhledem k tomu, že u brambor je rozhodující udržování vysoké úrovně heterozygotnosti, je lepší převést dihaploidy zpět na úroveň tetraploidu. Mendiburu *et al.* (1974) uvedli, že polyploidizace kolchicinem není vhodná a navrhl použití 2n gamet diploidních rostlin.

**Obrázek 4:** Schéma křížení brambor, které kombinuje techniky tkáňových kultur a metod klasického šlechtění (převzato a upraveno podle Wenzel *et al.* 1979)



Wenzel *et al.* (1979) ve svém schématu naznačili, že alternativně mohou být pro kombinování kompletních genomů včetně všech dominantních znaků haploidních linií, použity techniky fúze protoplastu. Takto vytvořené tetraploidní rostliny mohou být množeny hlízami, čímž se stabilizuje syntetizovaný genotyp. Praktické využití tohoto schématu bylo realizováno při šlechtění brambor odolných proti virům X, Y, viru svinutky bramborové a háďátku bramborovému. Takto získané odolnosti jsou dále děděny kvantitativně i kvalitativně.

## 4 Materiál a metody zpracování

### 4.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pro vypěstování donorových rostlin poskytla pro tuto práci Katedra genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze. Tímto materiálem byly genotypy rodu *Solanum* vzniklé somatickou hybridizací mezi druhy *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a *Solanum bulbocastanum*. Donorové rostliny, ze kterých byl proveden odběr explantátů, byly vypěstovány na pokusném pozemku Demonstračního a experimentálního pracoviště FAPPZ ČZU v Praze.

Experiment probíhal v letech 2016–2018. Na základě výsledků bakalářské práce (Suková, 2016) byly pro pokus v roce 2016 vybrány následující genotypy: REG 38F, REG 68F, REG 72F a REG 42F.

V následujícím roce byly k těmto genotypům přidány ještě genotypy REG 39F, REG 46F, REG 47F, REG 50F, REG 70F a vynechán genotyp REG 72F.

Dle počtu indukovaných kalusů z experimentu v bakalářské práci (Suková, 2016) byly použité genotypy rozděleny do 3 skupin:

1. skupina s vyšší indukcí kalusů (4-8): genotypy REG 32F, REG 38F, REG 68F
2. skupina s menší indukcí kalusů (1-4): genotypy REG 41F, REG 42F, REG 50F, REG 70F
3. skupina bez indukce kalusů: genotypy REG 39F, REG 46F, REG 47F.

#### 4.1.1 Odběr rostlinného materiálu

Sběr pupat z donorových rostlin probíhal v průběhu června až srpna 2016 a 2017. Odebraná pupata byla vložena do označených polypropylenových zkumavek.

#### 4.1.2 Stanovení vývojového stádia pylových zrn

Pro kultivaci prašníků *in vitro* je důležité, aby obsahovaly pylová zrna v raném jednojaderném až dvoujaderném vývojovém stádiu.

V bakalářské práci (Suková, 2016), na kterou tato práce navazuje, byl podrobně popsán způsob zjišťování vývojového stádia acetokarmínovou metodou, proto zde již nebude popisována.

### 4.1.3 Stresové předošetření pupat

Odebraná pupata z mateřských rostlin byla před izolací a kultivací prašníků vystavena třem typům stresového předošetření

- pupata byla na 24 hodin uložena do chladicího boxu s konstantní teplotou 4 °C
- pupata byla 10 minut centrifugována na centrifuze 5430R při otáčkovém ekvivalentu 1203 rpm
- pupata byla v miskách se sterilní vodou uložena do laboratorní třepačky na 60 minut při teplotě 30 °C

### 4.1.4 Sterilizace předošetřených pupat

Povrchové ošetření sterilizací proběhlo použitím dvou dezinfekčních přípravků v následujících 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 dezinfekce pokračovala máčením pupat v 12% roztoku Sava (odpovídá 0,56% roztoku NaClO) po dobu 20 minut.

Poté, již v aseptickém prostředí laminárního boxu (Gelaire TC48 Flow laboratories), byla pupata promyta 3x sterilní destilovanou vodou a uložena do uzavřených sterilních Petriho misek, aby se zabránilo jejich vysychání.

### 4.1.5 Kultivace prašníků

#### 4.1.5.1 Příprava médií

Pro kultivaci prašníků bylo připraveno 5 variant kultivačních médií, lišících se koncentrací základního média a přidanými aditivami a růstovými rostlinnými regulátory. Jako základ bylo použito médium MS (Murashige *et* Skoog, 1962). Pro varianty C, D a G ve 100% koncentraci s přídavkem sacharózy 60 g.l<sup>-1</sup>, agaru 6 g.l<sup>-1</sup> a aktivního uhlí 5 g.l<sup>-1</sup> a pro varianty I a J v 50% koncentraci s přídavkem sacharózy 30 g.l<sup>-1</sup> a agaru 6 g.l<sup>-1</sup>. V tabulce 3 jsou uvedeny kombinace a koncentrace použitých rostlinných růstových regulátorů.

Média byla připravena standardními postupy a pH upraveno na hodnotu 5,7 použitím 0,1M roztoku KOH. Následně byla média sterilizována parou při teplotě 121 °C a přetlaku

100 kPa po dobu 20 minut. Přidání rostlinných růstových regulátorů do médií a rozlití do Petriho misek probíhalo asepticky v laminárním boxu.

**Tabulka 3:** Rostlinné růstové regulátory v kultivačních médiích pro indukci kalusů

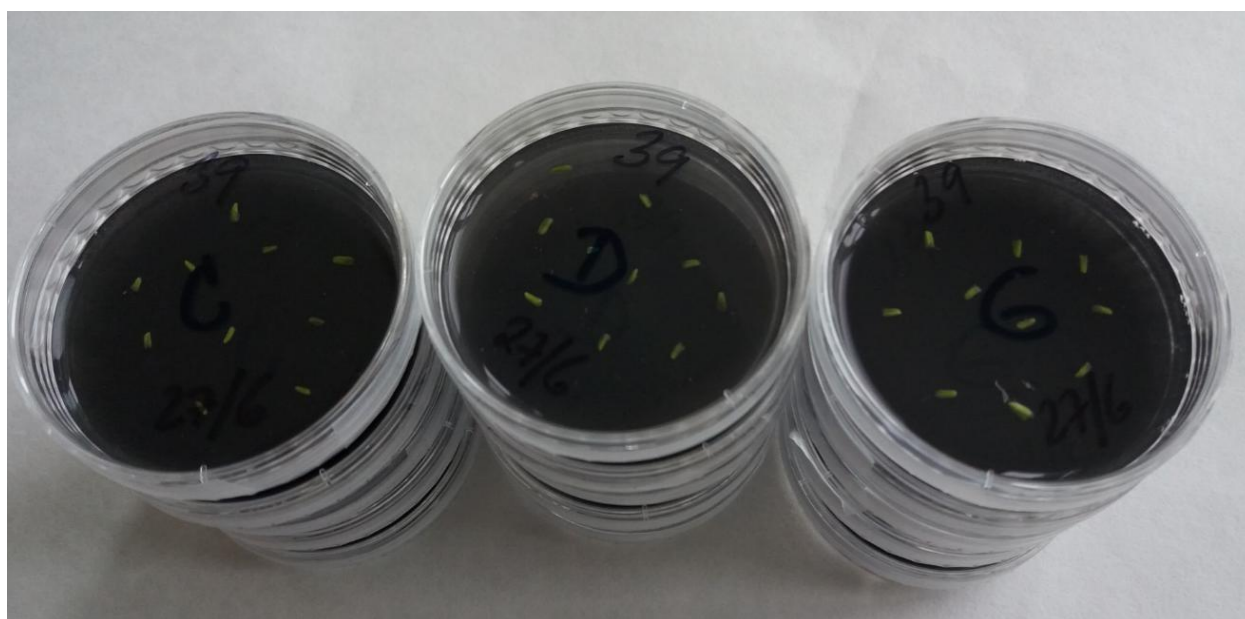
Médium	Rostlinné růstové regulátory (mg.l <sup>-1</sup> )						
	cytokininy				auxiny		
	BA	BAP	kinetin	zeatin	2,4-D	NAA	IAA
<b>C</b>		0,5					
<b>D</b>			0,5		1		
<b>G</b>		0,5			2		
<b>I</b>	10					1	
<b>J</b>	30			4			0,2

#### 4.1.5.2 Izolace prašníků

Izolace prašníků byla prováděna v laminárním boxu. Pomocí preparační jehly byly z povrchově dezinfikovaných pupat vylamovány prašníky a vkládány do Petriho misek s kultivačním médiem. Na každou misku byly umístěny prašníky ze dvou pupat jednoho genotypu. Každá miska byla popsána symbolem použitého genotypu, kultivačního média a data založení pokusu a zalepena parafinovou fólií (Obrázek 5).

Pro každý genotyp, médium a stresové předošetření bylo založeno 5 Petriho misek.

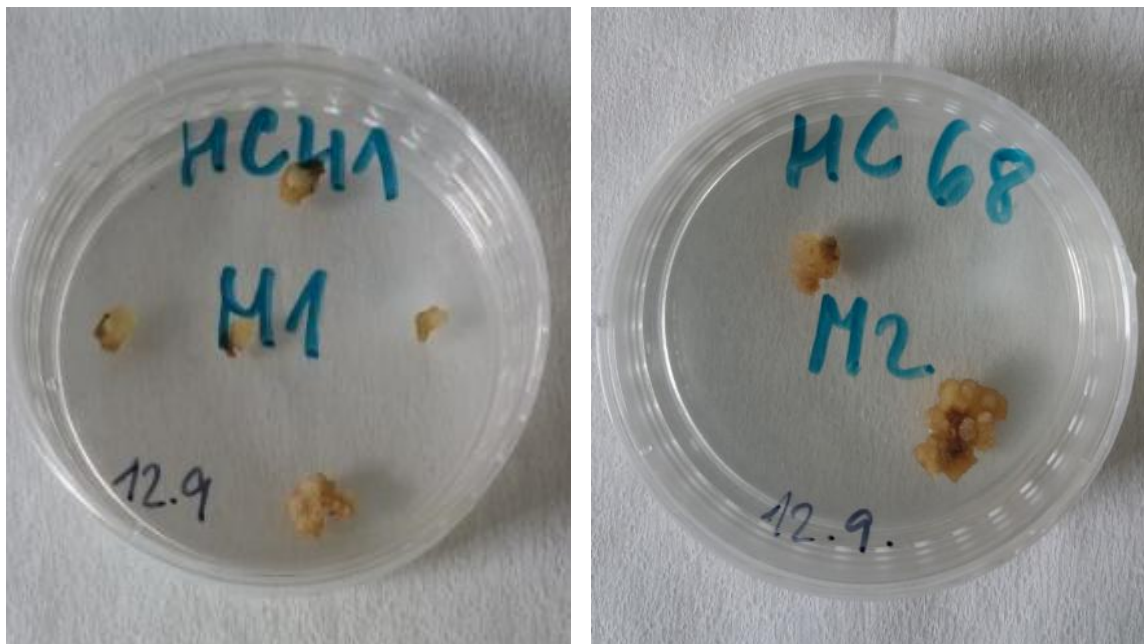
**Obrázek 5:** Petriho misky s izolovanými prašníky po založení pokusu



### 4.1.5.3 Indukce kalusů

Kultivace prašníků probíhala 10 týdnů v úplné tmě při teplotě  $25 \pm 1$  °C. Poté byly vybrané kalusy spočítány (Obrázek 6).

**Obrázek 6:** Kalusy získané po 10týdenní kultivaci prašníků, přepasážívané na regenerační médium pro indukci organogeneze



### 4.1.6 Regenerace celistvých rostlin

Organogeneze je proces, při kterém vznikají jednotlivé rostlinné orgány. Pro indukci organogeneze kalusů byly použity 2 varianty regeneračních médií, jehož základ tvoří plné MS médium s přídavkem sacharózy  $60 \text{ g.l}^{-1}$  a agaru  $6 \text{ g.l}^{-1}$ . Kombinace a koncentrace použitých rostlinných růstových regulátorů jsou v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Rostlinné růstové regulátory v kultivačních médiích pro indukci organogeneze

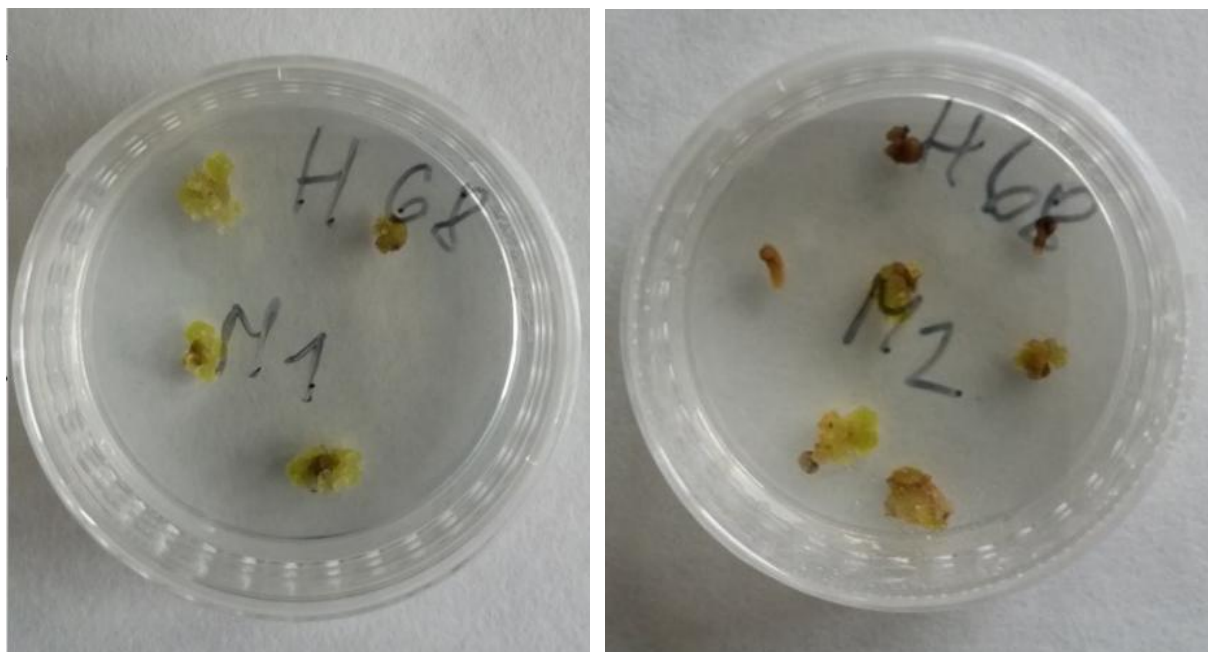
Médium	Rostlinné růstové regulátory ( $\text{mg.l}^{-1}$ )		
	cytokininy		giberiliny
	TDZ	BAP	GA3
M1	2		0,25
M2		2	0,25

Vybrané kalusy byly z indukčního média přepasážovány na médium pro indukci organogeneze a umístěny do kultivačního boxu (Sanyo MLR – 351H). Vzhled kalusů byl průběžně kontrolován (Obrázek 7).

V kultivačním boxu byly nastaveny tyto parametry kultivace

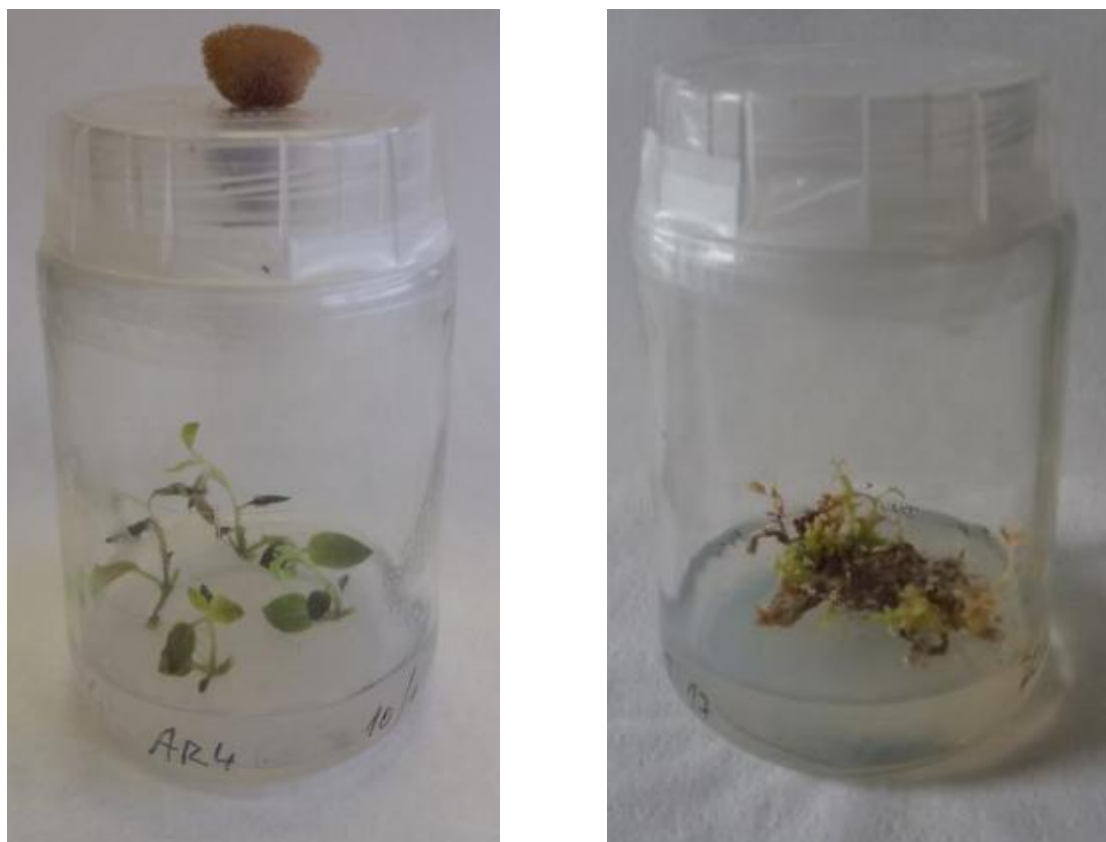
- fotoperioda 16 hodin den/ 8 hodin noc
- teplota 24 °C ve dne a 18 °C v noci
- 50% relativní vzdušná vlhkost
- hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů (PPF) - 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
- intenzita osvětlení 14500 lx

**Obrázek 7:** Kalusy po 4 týdnech kultivace na regeneračním médiu pro indukci organogeneze po 4 týdnech



V případě regenerace prýtu, byly tyto prýty postupně oddělovány a pasážovány do označených skleněných kultivačních skleniček s objemem 150 ml na čisté MS médium. Nádoby byly uzavřeny umělohmotným uzávěrem B-cap (Sigma) s odvětrávacím otvorem a molitanovou zátkou. Okraj uzávěru byl zabezpečen parafínovým filmem, aby nedocházelo k vysoušení a kontaminaci (Obrázek 8). Poté byly skleničky opět umístěny do kultivačního boxu.

**Obrázek 8:** Samostatné zregenerované prýty (vlevo) a mateřský kalus pro regeneraci dalších prýtů (vpravo)



#### 4.1.7 Testování ploidie zregenerovaných rostlin

Stupeň ploidie u zregenerovaných rostlin byl testován metodou průtokové cytometrie. Jádra buněk byla barvena fluorescenčním barvivem DAPI. Vzorek byl připraven nasekáním 1–4 lístků v 1 ml OTTO1, aby došlo k uvolnění jader z buněk. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes mikrofiltr do zkumavky. K této směsi byl přidán 1 ml OTTO2 s DAPI. Analýza obsahu DNA izolovaných jader ve vzorku byla měřena na průtokovém cytometru CyFlow Space.

#### 4.1.8 *In vitro* kultivace rostlin a převod do nesterilních podmínek

Z regenerovaných prýtů byly po několika týdnech kultivace odebrány řízky s 2-3 nodálními lístky a přepasážovány do nových nádob s MS médiem a opět umístěny do kultivačního boxu k další kultivaci. Do jedné nádoby byly umístěny 3-4 řízky jedné zregenerované rostliny.



Po 4-6 týdnech kultivace regenerantů *in vitro* byly rostliny přesazeny do perlitu. V následujících dnech byly ponechány v laboratoři při běžné provozní teplotě s vysokou vzdušnou vlhkostí (Obrázek 9).

**Obrázek 9:** Zregenerované rostliny v perlitu



#### **4.1.9 Metodika zpracování a vyhodnocení výsledků**

V experimentu bylo použito několik genotypů rostlin. Pro každý genotyp byly testovány různé typy stresového předošetření, různé druhy médií pro indukci kalusů a pro indukci organogeneze. Lze předpokládat, že existují rozdíly mezi kombinacemi vlivu média, genotypu i stresového předošetření na úspěšnou indukci kalusů a následnou organogenezi.

Tyto předpoklady byly ověřeny analýzou rozptylu v programu Statistica CZ (Statsoft verze 12.0) a statisticky zhodnoceny na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

## 5 Výsledky

Tato práce navazuje na bakalářskou práci (Suková, 2016) a výsledky jsou provázány s metodikou, která v ní byla použita. V bakalářské práci (Suková, 2016) byla metodika navržena na základě dosažitelných literárních pramenů a přizpůsobena laboratorním podmínkám školy.

### 5.1 Vliv faktorů na tvorbu kalusů

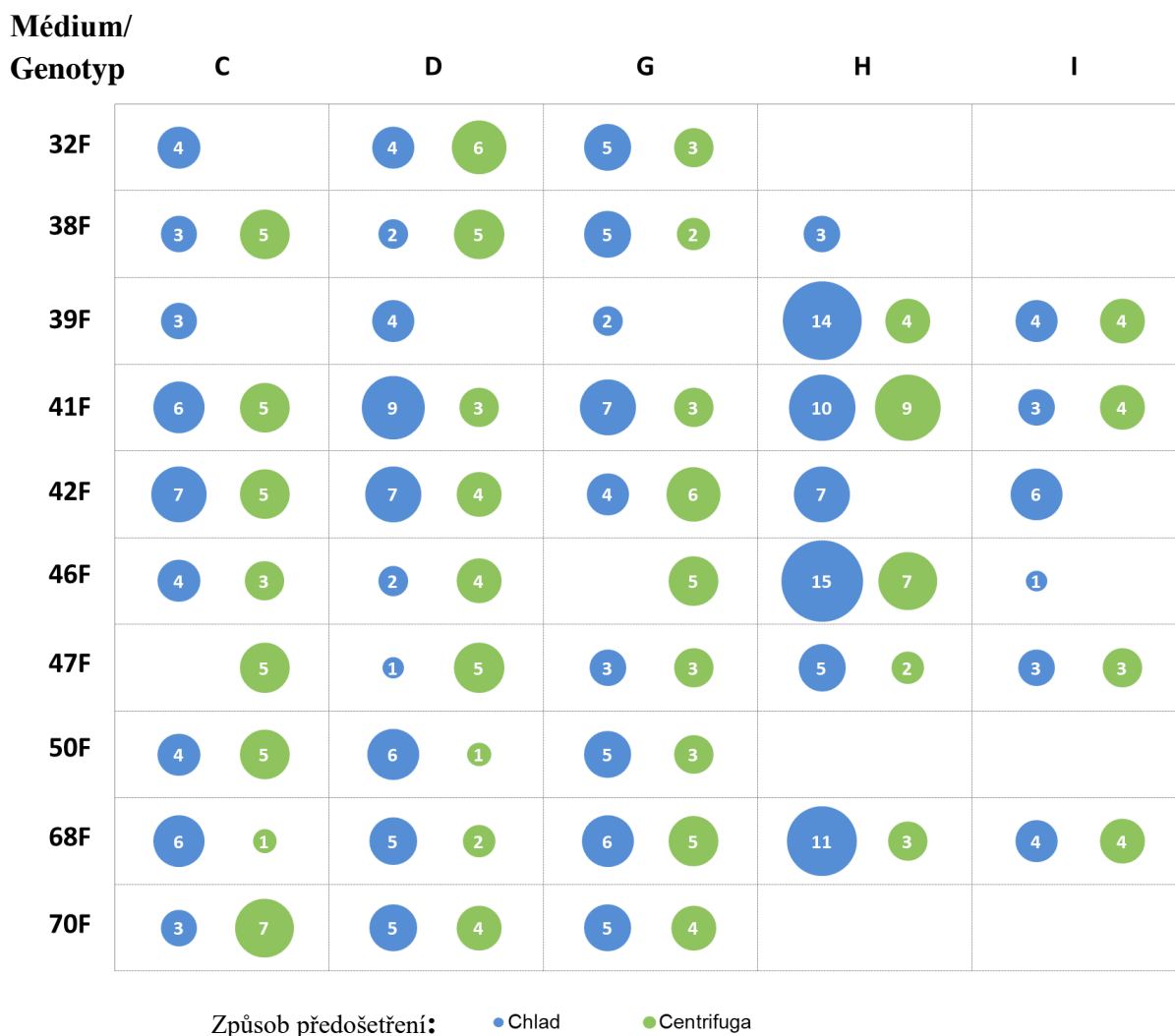
Byly testovány vlivy genotypů, stresového předošetření (chladem, teplem a centrifugací) a kultivačních podmínek na indukcí kalusů a následnou organogenezi. Při kultivaci prašníků v pokusu v roce 2016 došlo k rozsáhlé a nerovnoměrné kontaminaci Petriho misek bakteriemi, a proto nebylo možné výsledky statisticky vyhodnotit. V pokusu v roce 2017 byl rozšířen počet testovaných genotypů a kultivačních podmínek na indukcí kalusů. Na druhou stranu bylo použito stresové předošetření pouze chladem a centrifugací.

V roce 2017 bylo z celkového počtu přibližně 5000 izolovaných prašníků po šesti týdnech kultivace získáno 357 kalusů, což odpovídá výtěžnosti 7 %. Velikost kalusů byla v rozmezí 1-12 mm. Kalusy měly bělavou až nažloutlou barvu a byly kompaktní. Na výsledky pokusu mohlo mít vliv několik faktorů: genotyp, fyziologický stav rostlin, čas sběru a stresové předošetření poupat, stádium vývoje pylu při inokulaci a kultivační podmínky a každý faktor mohl být zatížen určitou chybou. Detailní graf četností získaných kalusů z pohledu jednotlivých genotypů dokumentuje tabulka 5 a graf 1.

**Tabulka 5:** Počet získaných kalusů v rozdělení dle genotypu, použitého média a způsobu předošetření

Médium/ Genotyp	Předošetření chladem					Předošetření centrifugací				
	C	D	G	H	I	C	D	G	H	I
REG 32F	4	4	5	0	0	0	6	3	0	0
REG 38F	3	2	5	3	0	5	5	2	0	0
REG 39F	3	4	2	14	4	0	0	0	4	4
REG 41F	6	9	7	10	3	5	3	3	9	4
REG 42F	7	7	4	7	6	5	4	6	0	0
REG 46F	4	2	0	15	1	3	4	5	7	0
REG 47F	0	1	3	5	3	5	5	3	2	3
REG 50F	4	6	5	0	0	5	1	3	0	0
REG 68F	6	5	6	11	4	1	2	5	3	4
REG 70F	3	5	5	0	0	7	4	4	0	0

**Graf 1:** Počet získaných kalusů v rozdělení dle genotypu, použitého média a způsobu předošetření.



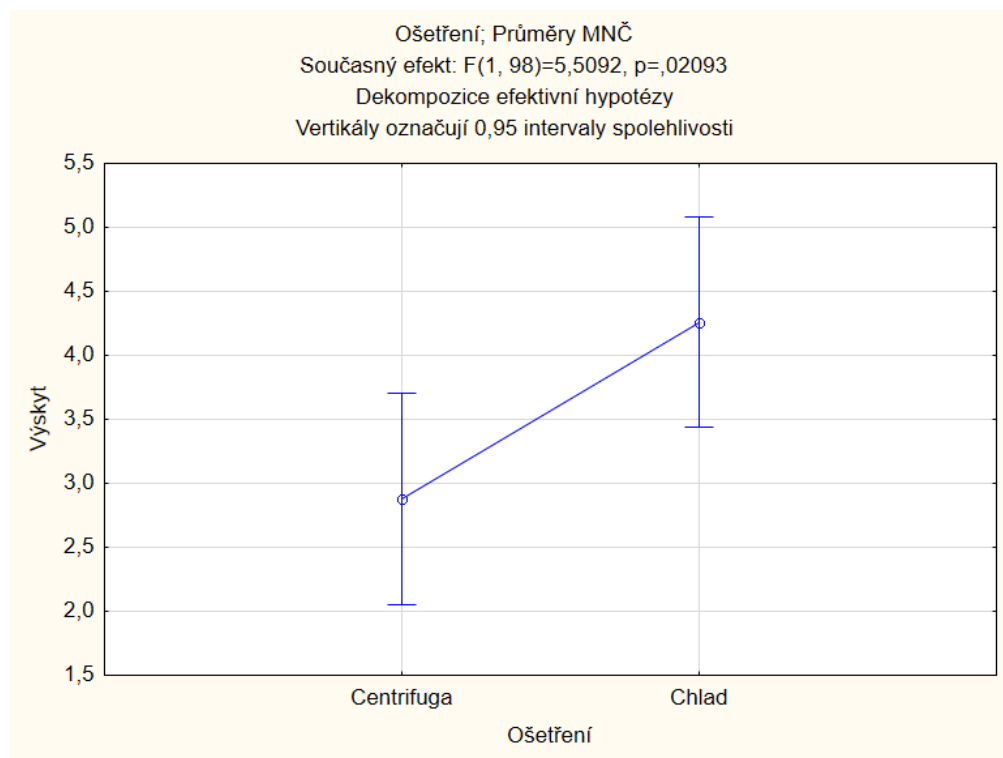
### 5.1.1 Vliv stresového předošetření

V této práci byly použity různé způsoby stresového předošetření. V experimentu z roku 2016 to bylo předošetření chladem, vysokou teplotou a centrifugací, zatímco v roce 2017 pouze předošetření chladem a centrifugací.

Vzhledem k nerovnoměrné a masivní kontaminaci v roce 2016 výsledky pro předošetření vysokou teplotou nejsou dostupné. Průměrný počet získaných kalusů v roce 2017 při chladovém předošetření byl  $4,26 \pm 2,88$  a při ošetření centrifugací  $3,42 \pm 2,37$ . Statistické vyhodnocení výsledků ukázalo signifikantní rozdíl v počtu kalusů získaných kultivací prašníků vzhledem

k použitému typu stresového předošetření poupat. Pro testování byl použitý T-test pro nezávislé vzorky na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Graf 2).

**Graf 2:** Vliv stresového předošetření na počet získaných kalusů. Průměrné počty kalusů  $\pm$  směrodatná odchylka. Hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .



### 5.1.2 Vliv genotypů

U všech genotypů došlo k odezvě prašníků. Průměrný počet získaných kalusů u prašníků s nejvyšší odezvou byl u genotypů REG 41F  $5,9 \pm 2,59$ , u REG 68F  $4,7 \pm 2,61$  a u REG 42F  $4,6 \pm 2,54$ . Průměrné počty všech získaných kalusů jsou v tabulce 6.

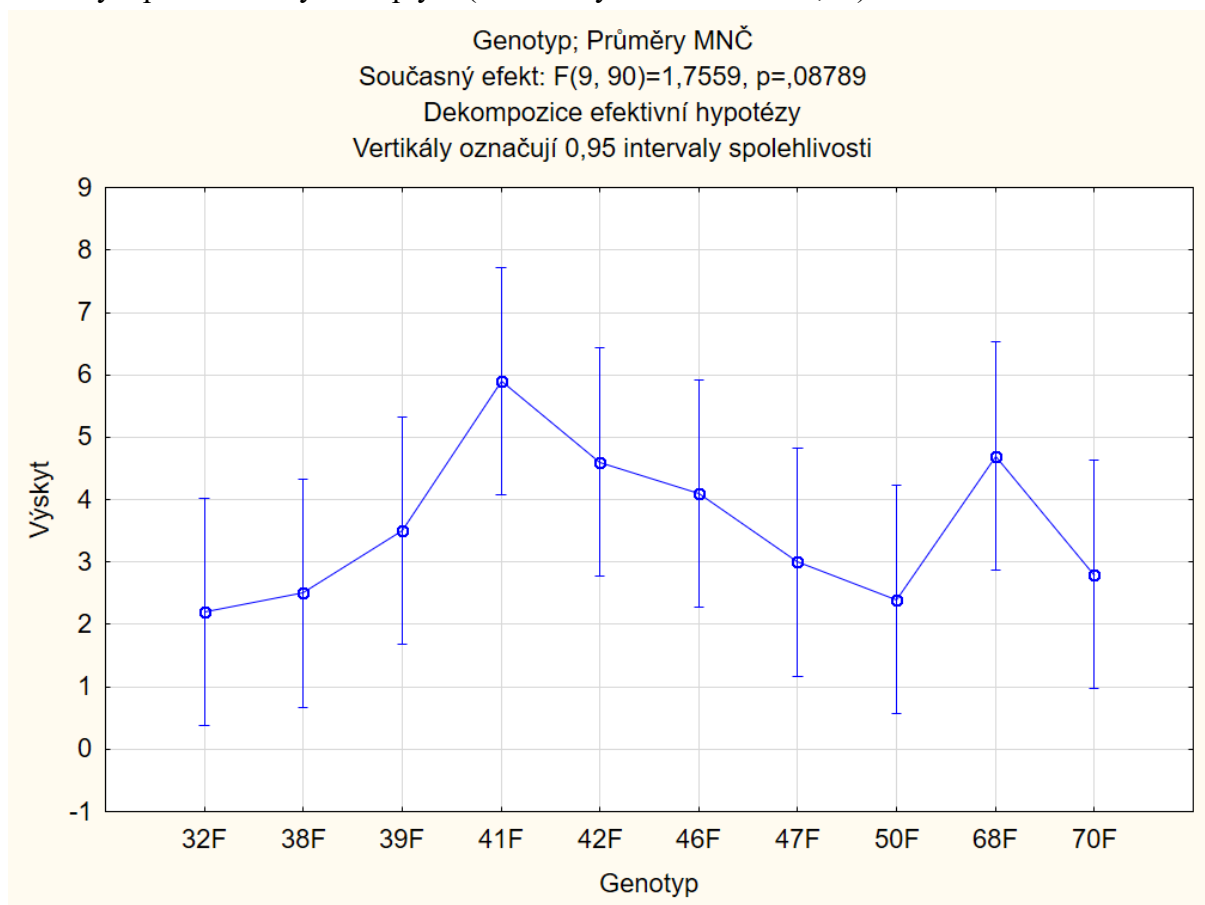
**Tabulka 6:** Průměrný počet kalusů získaných kultivací prašníků u jednotlivých genotypů.

Genotyp	32F	38F	39F	41F	42F	46F	47F	50F	68F	70F
<b>Průměr</b>	2,20	2,50	3,50	5,90	4,60	4,10	3,00	2,40	4,70	2,80
<b>Směrodatná odchylka</b>	2,32	1,96	3,88	2,59	2,54	4,21	1,61	2,33	2,61	2,48

Byl testován vliv jednotlivých genotypů na zisk kalusů. Zjištěné hodnoty byly statisticky zpracovány metodou analýzy rozptylu (Graf 3 a Tabulka 7). Vzhledem k tomu, že na hladině

významnosti  $\alpha = 0,05$  nevyšel průkazný F-test ( $p > 0,05$ ), odchylky v získaném počtu kalusů nejsou způsobeny primárně pouze genotypem.

**Graf 3:** Průměrný počet kalusů získaných kultivací prašníků u jednotlivých genotypů. Pro testování byla použita analýza rozptylu (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ).



**Tabulka 7:** Analýza rozptylu zisku kalusů vyhodnocená pro všechny genotypy (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ).

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Výskyt (Data_DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	1274,490	1	1274,490	150,7479	0,000000
Genotyp	133,610	9	14,846	1,7559	0,087887
Chyba	760,900	90	8,454		

Byl také testován vliv genotypů, rozdělených dle indukce kalusů v experimentu bakalářské práce (Suková, 2016), na zisk kalusů. Do 1. skupiny byly zařazeny genotypy, u kterých bylo získáno 4-8 kalusů, ve 2. skupině byly genotypy s 1-4 kalusy a u genotypů ve 3. skupině nedošlo k žádné indukci kalusů. U první skupiny bylo získáno 94 kalusů, u druhé

skupiny 157 kalusů a u třetí 106 kalusů. Metodou analýzy rozptylu bylo potvrzeno, že mezi skupinami neexistuje statisticky významný rozdíl v zisku kalusů (Tabulka 8).

**Tabulka 8:** Analýza rozptylu zisku kalusů vyhodnocená pro genotypy, které jsou rozděleny dle indukce kalusů v bakalářské práci (Suková, 2016) do 3 skupin (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ )

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Výskyt (Data_DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	1223,819	1	1223,819	134,3321	0,000000
Skupina	10,802	2	5,401	0,5928	0,554756
Chyba	883,708	97	9,110		

### 5.1.3 Vliv složení médií na indukci kalusů

Dále byl testován vliv složení 5 různých médií na zisk kalusů. Průměrné počty kalusů na jednotlivých médiích jsou v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Průměrný počet kalusů získaných kultivací prašníků u jednotlivých genotypů.

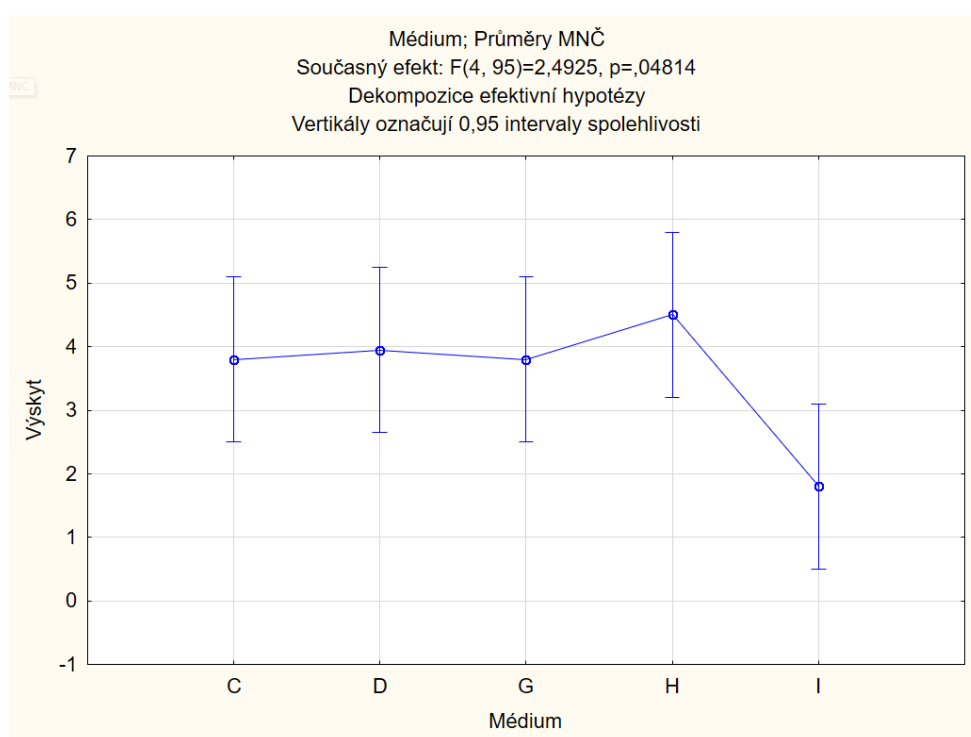
Médium	C	D	G	H	I
Průměr	3,80	3,95	3,80	4,50	1,80
Směrodatná odchylka	2,14	2,16	1,83	4,89	1,99

Zjištěné hodnoty byly statisticky zpracovány metodou analýzy rozptylu (Tabulka 10 a Graf 4). Vzhledem k tomu, že vyšel průkazný F-test, můžeme na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  říci, že existuje alespoň jedna dvojice médií, která se mezi sebou statisticky významně liší. Proto bylo provedeno podrobnější vyhodnocení Tukeyho metodou, které ukázalo signifikantní rozdíl mezi médii H a I (Tabulka 11). Průměrný zisk kalusů na médiu I byl  $1,8 \pm 1,99$ , zatímco na médiu H byl  $4,5 \pm 4,89$ . U obou médií byl velice nevyrovnaný zisk kalusů ve vztahu ke genotypu a typu předošetření.

**Tabulka 10:** Analýza rozptylu zisku kalusů vyhodnocená pro všechny média (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ).

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Výskyt (Data_DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	1274,490	1	1274,490	149,5603	0,000000
Médium	84,960	4	21,240	2,4925	0,048145
Chyba	809,550	95	8,522		

**Graf 4:** Průměrný počet kalusů získaných kultivací prašníků na jednotlivých médiích. Pro testování byla použita analýza rozptylu (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ).



**Tabulka 11:** Podrobné vyhodnocení Tukeyho metodou. Jako třídící faktor bylo použito médium.

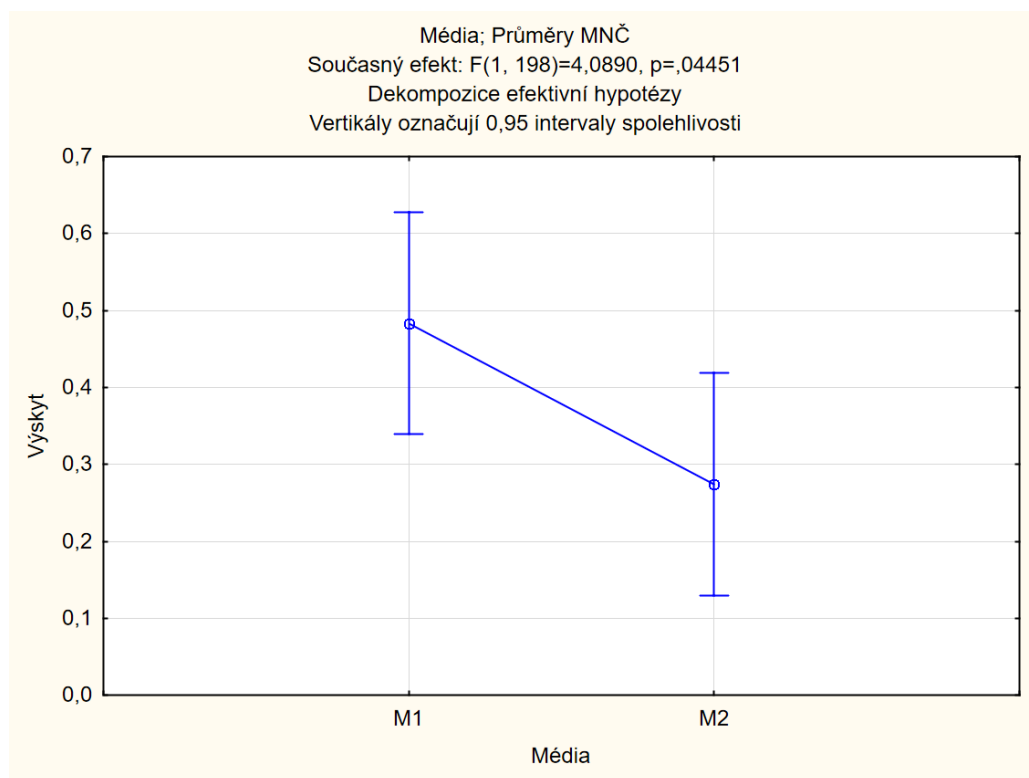
Č. buňky	Médium	Tukeyův HSD test; proměnná Výskyt (Data_DP) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: Between MSE = 8,5216, sv = 95,000				
		{1} 3,8000	{2} 3,9500	{3} 3,8000	{4} 4,5000	{5} 1,8000
1	C		0,999860	1,000000	0,941834	0,201524
2	D	0,999860		0,999860	0,975463	0,144916
3	G	1,000000	0,999860		0,941834	0,201524
4	H	0,941834	0,975463	0,941834		0,034247
5	I	0,201524	0,144916	0,201524	0,034247	

### 5.1.4 Testování regeneračního média

Byl testován vliv regeneračního média na indukci organogeneze u kalusů, získaných z prašníků po 10 týdnech kultivace v pokusu v roce 2017. Z 357 kalusů bylo 211 umístěno na médium M1 a 146 na médium M2. Vitalita kalusů byla statisticky vyhodnocena po přibližně 4 týdnech. Vzhledem k tomu, že výchozí počty kalusů umístěvaných na regenerační média nebyly stejné, byla data pro statistické zpracování normovaná, aby získané výsledky nebyly touto skutečností zkresleny. Na médiu M1 bylo 48 % vitálních kalusů, na médiu M2 jich bylo 27 %. Statistické vyhodnocení výsledků ukázalo, že existuje signifikantní rozdíl v počtu vitálně rostoucích kalusů vzhledem k použitému médiu. Pro testování byl použitý T-test pro nezávislé vzorky na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (Graf 5).

Vitální kalusy byly přepasážovány na stejné medium a opět uloženy do kultivačního boxu.

**Graf 5:** Vliv regeneračních médií na růst vitálních kalusů. Průměrné počty kalusů  $\pm$  směrodatná odchylka. Hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

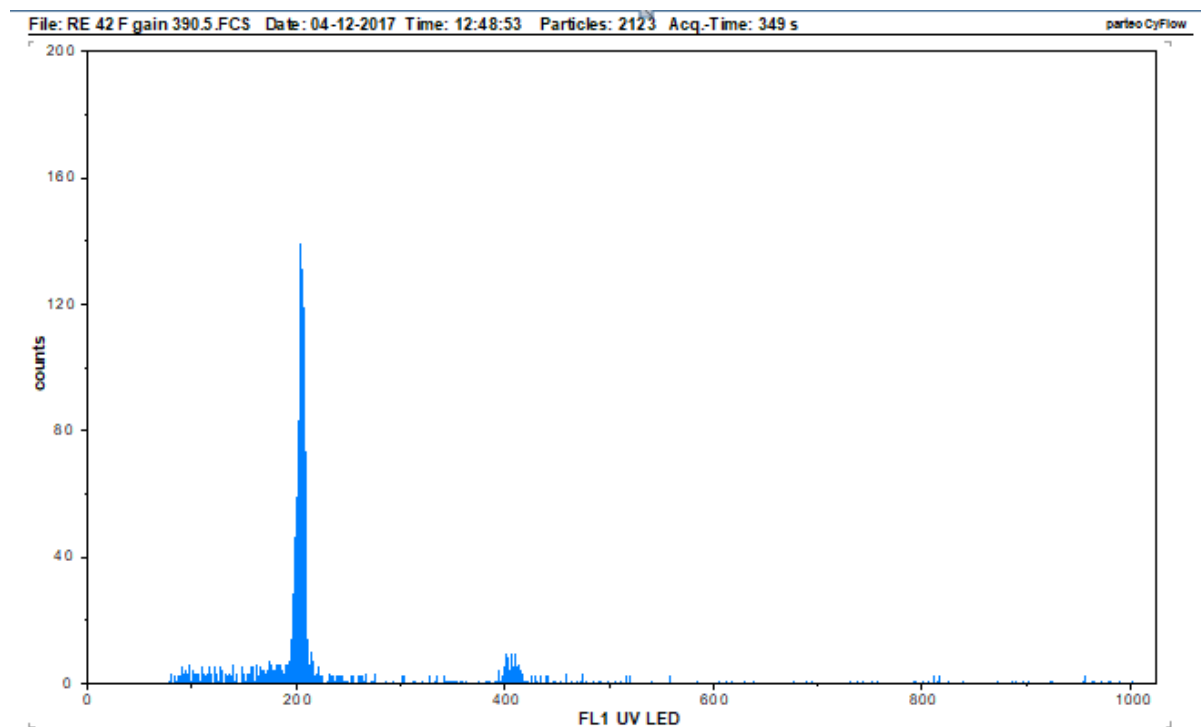




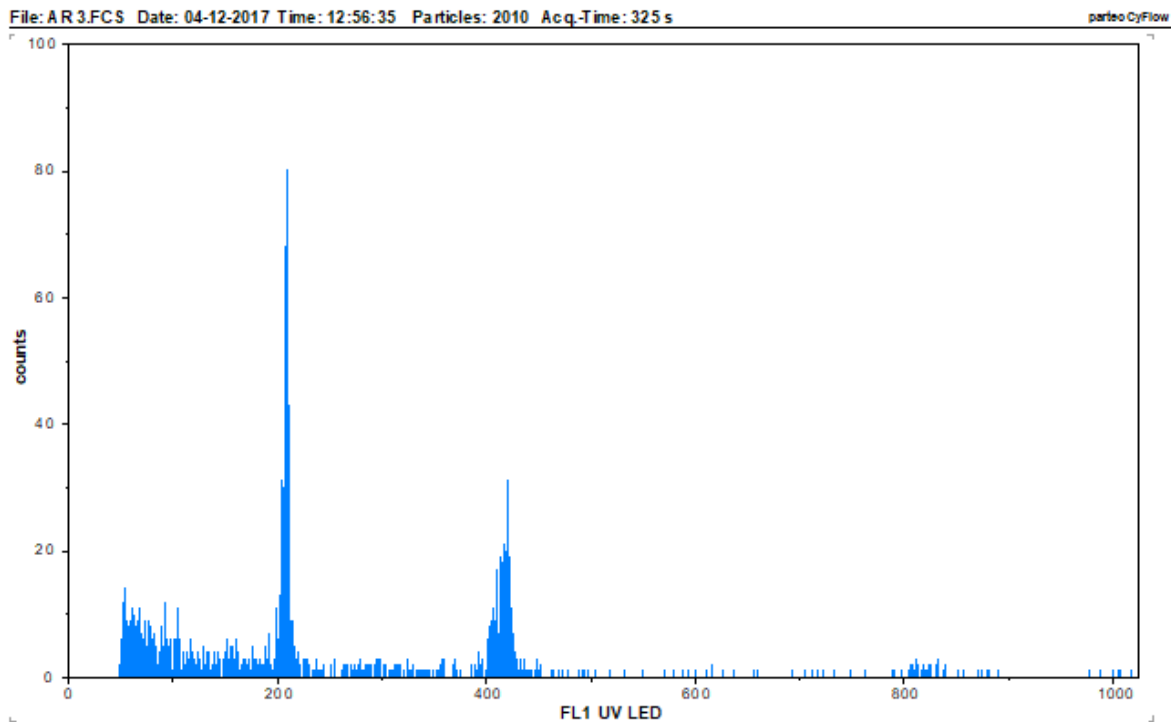
### 5.1.5 Testování ploidie zregenerovaných rostlin

Metodou průtokové cytometrie byla proměřena ploidie u 4 vzorků, získaných organogenezí v roce 2016. Jeden z nich byl kontrolní vzorek (původní tetraploidní genotyp REG42 F), zbylé tři byly rostliny zregenerované z 3 různých prýtů kalusů indukovaných z prašníků tohoto genotypu. Označení jednotlivých regenerantů je AR3, AR4, AR5. Průtokový cytometr byl nastaven tak, aby kontrolní vrchol vycházel na kanálu 200 (na kanálu 400 je vrchol G2). U každého vzorku bylo analyzováno 2000 jader. Ploidie u referenčního vzorku a vzorku AR3 vyšly stejně, tzn rostliny byly tetraploidní (Obrázky 10 a 11). U vzorku AR4 a AR5 byla naměřena poloviční ploidie, tzn, rostliny byly dihaploidní (Obrázky 12 a 13).

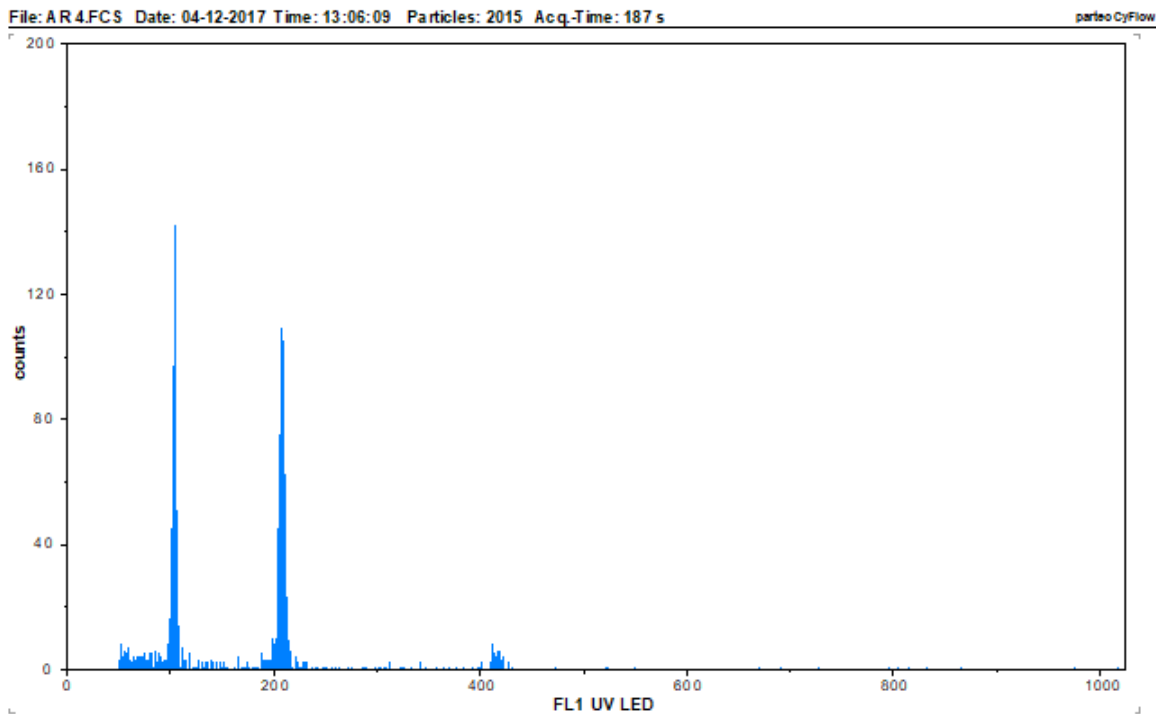
**Obrázek 10:** Výstup cytologického vyšetření genotypu somatického hybridu REG 42F (4n) získaný z průtokového cytometru CyFlow Space. Dva vrcholy představují obsah DNA v jádrech v G1 a G2 fázi buněčného cyklu.



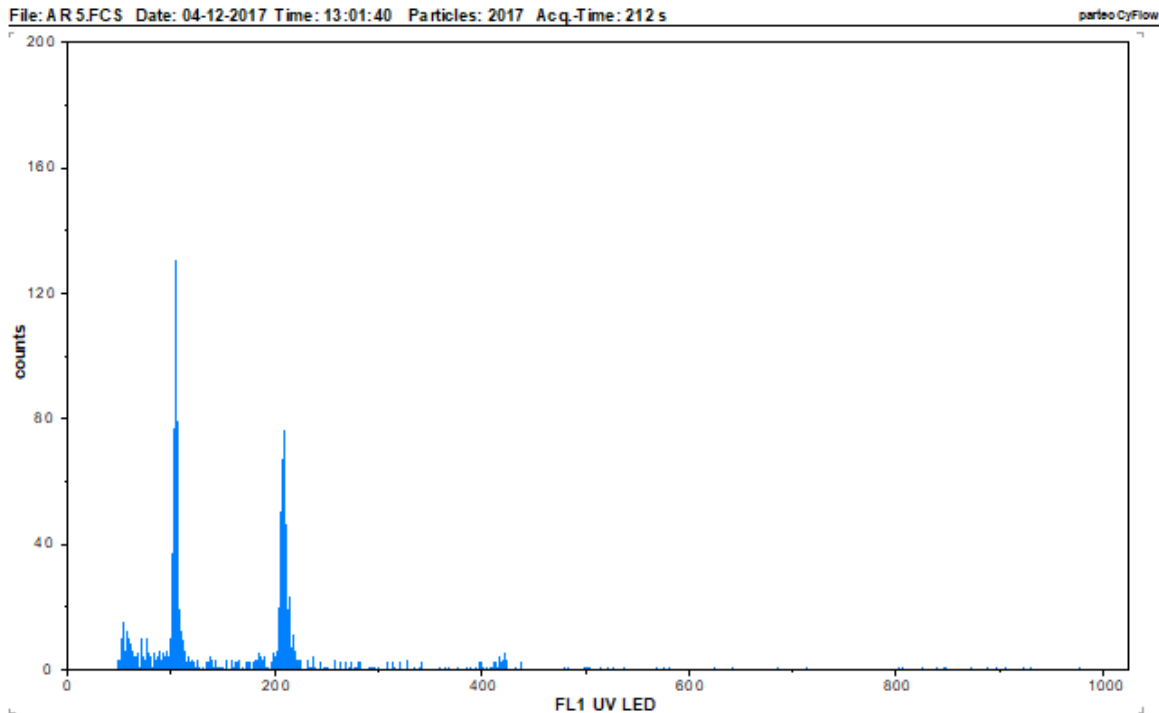
**Obrázek 11:** Výstup cytologického vyšetření regeneranta AR3 získaný z průtokového cytometru CyFlow Space. Dva vrcholy představují obsah DNA v jádrech v G1 a G2 fázi buněčného cyklu.



**Obrázek 12:** Výstup cytologického vyšetření regeneranta AR4 získaný z průtokového cytometru CyFlow Space. Dva vrcholy představují obsah DNA v jádrech v G1 a G2 fázi buněčného cyklu.



**Obrázek 13:** Výstup cytologického vyšetření regeneranta AR5 získaný z průtokového cytometru CyFlow Space. Dva vrcholy představují obsah DNA v jádrech v G1 a G2 fázi buněčného cyklu.



### 5.1.6 Převod do nesterilních podmínek *ex vitro*

Zregenerované rostliny se zatím nepodařilo převést do nesterilních podmínek. Po přesazení do perlitu a ponechání v běžných podmínkách laboratoře rostliny nezakořenily a přibližně po týdnů došlo k jejich odumření. Zatím jsou stále udržovány v podmínkách *in vitro*.

## 6 Diskuze

Brambory (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) byly jednou z prvních plodin, u kterých byly v procesu šlechtění použity haploidní techniky (Chase, 1963). K nejčastěji používaným metodám pro produkci haploidů patří indukovaná androgenese v prašниковých, pylových a mikrosporových kulturách (Germana, 2011). Pro experiment v této práci byla použita metoda prašnikových kultur.

Výchozím rostlinným materiálem bylo 10 tetraploidních genotypů, získaných fúzí protoplastů dvou genotypů *Solanum bulbocastanum* a *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (Sedláková, 2010). V experimentu v roce 2017 došlo k indukci kalusů u všech genotypů. Průměrná výtěžnost kalusů ze všech kultivovaných prašníků byla 0,6 %. Ve srovnání s prací Asakaviciute (2008) to bylo téměř 10x méně než nejnižší výtěžnost z použitých odrůd. U zkoumané odrůdy Noda byl zisk kalusů 5,0 %, u zbylých odrůd se pohyboval od 7,7 do 24 %.

Dle Sopory *et* Bajaj (1987) je kultivační odezva prašnikové kultury řízena geneticky i environmentálně a k nejdůležitějším faktorům patří původ dárcovských rostlin, vývojové stádium pylu, stresové předošetření a kultivační podmínky. Genotypy do této práce byly vybrány dle výsledků bakalářské práce (Suková, 2016) a rozděleny do 3 skupin dle zisku kalusů. Skupina 1: 4-8 kalusů, skupina 2: 1-4 kalusů a skupina 3: bez kalusů. Metodou analýzy rozptylu bylo potvrzeno, že mezi skupinami neexistuje statisticky významný rozdíl v zisku kalusů. Nejvyšší odezva byla u genotypu REG 41F, který patří do skupiny 2. Nejnižší odezva byla u genotypu REG 32F ze skupiny 1. Vzhledem k těmto výsledkům a tomu, že všechny genotypy jsou somatiční hybridy stejných rodičů, se nabízí vysvětlení, že indukce kalusů v našem experimentu mohla být environmentálně ovlivněna více než geneticky.

### Vliv stresového předošetření poupat

Volba stresového předošetření poupat závisí jak na jeho efektivitě při tvorbě embryogenních mikrospor, tak i na jeho dostupnosti (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Na základě výsledků bakalářské práce (Suková, 2016) bylo v této práci použito předošetření chladem a nově bylo vyzkoušeno předošetření centrifugací. Při chladovém předošetření bylo získáno 213 kalusů, při centrifugaci to bylo 144 kalusů.

V našem experimentu byla poupata vystavena nízké teplotě přibližně 24 hodin, i když Teparkum *et al.* (1998) a Aziz *et al.* (1999) uvádějí, že nasbíraná poupata zabalili do vlhkých papírových ubrousků a inkubovali je při teplotě 4 °C po dobu 72 hodin. Námí zvolený postup vycházel z dřívějších úspěšných experimentů (Suková, 2016).

Předošetření centrifugací patří k minoritně používaným ošetřením, které se ale může ukázat jako účinné při vyvolání embryogeneze mikrospor u druhů, kde použití majoritních stresorů nebylo úspěšné (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Vzhledem k technické nenáročnosti a dostupnosti jsme zvolili toto předošetření i v experimentech v letech 2016 a 2017. V roce 2016 se předošetření centrifugací ukázalo jako účinné a z kalusu získaného z prašníku poupěte ošetřeného právě tímto způsobem se podařilo zregenerovat celistvou rostlinu.

V pokusu v roce 2016 bylo navíc použito stresové ošetření vysokou teplotou. Chani *et al.* (2000) uvádí, že vystavením pupat tepelnému šoku 35 °C po dobu 12 hodin zvýšil výtěžnost embryí o 40 %, i když tepelný šok snížil rychlost regenerace rostlin. V našem experimentu v roce 2016 byla poupata vystavena 30 °C po dobu 60 minut. Teplota i doba půdobení teplotního stresu byla snížena z důvodu vysoké nekrotizace tkání pupat. Bohužel vzhledem k rozsáhlé kontaminaci Petriho misek výsledky tohoto předošetření nebyly vyhodnoceny.

### **Vliv indukčního média**

Jako základní médium bylo v experimentech roku 2016 i 2017 použito MS médium s přídavkem sacharózy a agaru. Použitá média byla obohacena o různé kombinace rostlinných růstových regulátorů.

Mix (1983) ve své práci s dihaploidními brambory uvedl, že na MS médiu s přídanou sacharózou 60 g.l<sup>-1</sup> a aktivním uhlím byla maximální odezva dosažena při přidání rostlinných růstových regulátorů IAA a BA a výměnou těchto hormonů za jiné se odezva prašníků snížila. U autotetraploidních brambor získal nejvyšší produkci kalusů použitím 0,1 µg.l<sup>-1</sup> zeatinu a 2 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D. V experimentu v roce 2017 na médiích s přídavkem aktivního uhlí byla odezva prašníků vyrovnána bez ohledu na přidané rostlinné růstové regulátory. To více odpovídá tvrzení Aionesei *et al.* (2005), že hormony jsou pro úspěšnou indukci méně důležité než stresové ošetření.

Dle publikace Sopory *et al.* (1978) má přídavek aktivního uhlí do média pozitivní efekt na indukci embryí. Aktivní uhlí pravděpodobně ovlivňuje absorpci inhibičních látek z agaru (Johansson *et al.*, 1982). Jak již bylo uvedeno výše, odezva prašníků na médiích s aktivním uhlím byla téměř stejná, na rozdíl od médií bez aktivního uhlí, kde byla odezva velice nerovnoměrná. Ve srovnání výtěžnosti kalusů na obou typech médií ale nelze jednoznačně říci, že by média s aktivním uhlím byla lepší.

Na médiu H (médium bez aktivního uhlí s přídavkem BA a NAA) byla odezva vyšší, na médiu I (médium bez aktivního uhlí s přídavkem BA, zeatinu a IAA) byla nižší. Na médiu H došlo k nejvyšší odezvě u genotypů REG 46F, REG 41F, REG 39F a REG 68F, zatímco

u genotypů REG 32F, REG 50F, REG 70F nedošlo k žádné. To ukazuje i na možnou interakci genotypu a kultivačního média.

### **Vliv regeneračního média**

V experimentu v roce 2016 bylo pro regeneraci kalusů použito pouze M1 médium (100% MS + TDZ+GA<sub>3</sub>). Vzhledem k pozitivním výsledkům bylo toto médium použito i v experimentu v roce 2017. V tomto roce bylo navíc použito M2 médium (100% MS + BAP + GA<sub>3</sub>). Použitá regenerační média byla zvolena na základě zjištění Kumlaya *et* Ercisli (2015). V jejich práci byl testován vliv různých kombinací rostlinných růstových regulátorů na stimulaci proliferaci prýtlů a kořenů z kalusů vzniklých z tkáňových explantátů 3 odrůd brambor. Jako explantáty byly použity listové a nodální segmenty rostlin. Z výsledků vyplynulo, že nejvhodnějším regeneračním médiem pro tvorbu prýtlů z kalusů je 100% MS médium s přídavkem BAP a GA<sub>3</sub> (M2 médium). Na tomto médiu došlo k 90% regeneraci prýtlů po přibližně 15 dnech indukce, zatímco na médiu M1 (s přídavkem TDZ a GA<sub>3</sub>) zregenerovalo pouze 41% kalusů po přibližně 29 dnech. Tyto výsledky neodpovídají statistickému vyhodnocení našeho experimentu z roku 2017, dle kterého byla vitalita kalusů na médiu M1 signifikantně vyšší než na médiu M2. Tento rozdíl může být způsoben použitím rozdílných tkáňových explantátů pro tvorbu kalusů. Určitý vliv na výsledky mohly mít i použité odrůdy brambor, které byly v obou experimentech rozdílné, a které jsou jedním z faktorů ovlivňující tvorbu kalusů a následně i regeneraci prýtlů.

### **Testování ploidie zregenerovaných rostlin**

Pro realizaci procesu androgeneze v podmínkách *in vitro* jsou využívány dvě hlavní techniky, prašnickové nebo pylové kultury. V našem experimentu v roce 2016 i 2017 byla použita technika prašnickových kultur. Nevýhodou této techniky je možnost regenerace rostlin nejen z mikrospor, ale i ze somatických pletiv, což vede k produkci rostlin s různým stupněm ploidie.

Pro stanovení ploidie zregenerovaných rostlin z roku 2016 byla použita metoda průtokové cytometrie. Jako kontrolní vzorek byla použita původní tetraploidní rostlina, dále byly testovány tři získané zregenerované rostliny, označené AR3, AR4 a AR5. Výsledky ukazují, že jedna zregenerovaná rostlina je tetraploidní, další dvě mají poloviční ploidii. Tetraploidní rostlina vznikla pravděpodobně z pletiva prašníku, zatímco dihaploidní rostliny vznikly z mikrospor.

## 7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na kultivaci prašníků vybraných 4n somatických hybridů (*Solanum tuberosum* + *Solanum bulbocastanum*) a následnou organogenezi. Experiment probíhal v letech 2016 a 2017 a byly dosaženy tyto výsledky.

- V roce 2016 se podařilo regenerovat 3 rostliny z prašnickového explantátu genotypu REG 42F, který prošel stresovým předošetřením centrifugací. Indukce probíhala na médiu 100% MS + 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 5 g.l<sup>-1</sup> aktivní uhlí a regenerace na médiu 100% MS + 2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 0,25 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.
- Metodou průtokové cytometrie bylo prokázáno, že jedna zregenerovaná rostlina je tetraploidní a dvě vykazují poloviční ploidii, tzn. jsou dihaploidní.
- Zregenerované rostliny jsou pěstovány v podmínkách *in vitro*, do nesterilního prostředí se je zatím převést nepodařilo.
  
- V roce 2017 z celkového počtu přibližně 5000 vyizolovaných prašníků bylo získáno 357 kalusů, jejichž velikost se pohybovala mezi 1-12 mm.
- Jako nejvhodnější se pro prašnickovou kulturu jevila poupata o velikosti 2-3 mm, protože obsahovala prašníky s mikrosporami v jednojaderném stádiu.
- Stresové předošetření pupat chladem (4 °C po dobu 24 hodin) bylo pro indukci prašníků vhodnější než předošetření centrifugací.
- Na médiích s přídavkem aktivního uhlí došlo k odezvě u všech genotypů, zatímco média bez přídavku aktivního uhlí se ukázala vhodná jen pro některé genotypy.
- Nejvyšší počet kalusů (90 ks) byl získán na médiu bez přídavku aktivního uhlí 50% MS + 10mg.l<sup>-1</sup> BA + 1 mg.l<sup>-1</sup> NAA. Navíc u genotypů REG 46F a REG 39F bylo na tomto médiu získáno nejvíce kalusů v absolutním počtu. Jejich velikost byla 3-12 mm.
- Nejlepší výsledky byly dosaženy u genotypu REG 41F, u kterého došlo k tvorbě kalusů na všech typech médií.
- Byl prokázán vliv regeneračního média na růst kalusů. Lepších výsledků bylo dosaženo u média 100% MS + 2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 0,25 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.

Výsledky experimentu naznačují, že vhodnou kombinací faktorů lze, prostřednictvím nepřímé indukované androgenese, získat zregenerované rostliny s poloviční ploidii. Nelze ale jednoznačně říci, jestli převládl vliv některého z faktorů (genotyp, stresové předošetření či

médium) nebo jestli se jednalo o vhodnou kombinaci více faktorů. Výsledky také nevyklučují možnost existence dalších faktorů ovlivňujících proces indukované androgeneze, které ale nebyly měřeny. Nižší vitalita zregenerovaných rostlin a neúspěch při převodu do podmínek *ex vitro* ukázaly, že tento proces není optimální. Nicméně byl získán pouze velmi malý počet regenerantů, proto tento výsledek nemusí být dostatečně vypovídající. Navíc vzhledem k časové náročnosti experimentů byly vyzkoušeny jen některé typy médií a stresového předošetření. Přesto získané poznatky, spolu se získanými zregenerovanými rostlinami jsou cennou informací o tom, jak indukovaná androgeneze u brambor funguje.



## 8 Seznam použité literatury

- Aionesei, T., Touraev, A., & Heberle-Bors, E. 2005. Pathways to Microspore Embryogenesis. In *Haploids in Crop Improvement II* (pp. 11–34). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Asakaviciute, R., 2008. Androgenesis in Anther Culture of Lithuanian Spring Barley *Hordeum vulgare* L. and Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Turkish Journal of Biology*, 32(3), 155-160.
- Armstrong, T. A., Metz, S. G., & Mascia, P. N. 1987. Two regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Science*, 51(2–3), 231–237.
- Aziz, A. N., Seabrook, J. E. A., & Tai, G. C. C. 1999. Amplification of RAPD markers from individual pollen grains of a diploid *Solanum* clone 9507-04. *American Potato Journal*, 76, 179-182.
- Bajaj, Y. P. S. 1990. *In vitro* Production of Haploids and Their Use in Cell Genetics and Plant Breeding. In *Haploids in Crop Improvement I* (pp. 3–44). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bajaj, Y. P. S., Reinert, J., Heberle, E. 1977. Factors enhancing *in vitro* production of haploid plants in anther and isolated microspore cultures. In: Gautheret R (ed) *La culture des tissue et des cellules des ve'ge'taux*. Mason, Paris, pp 47–58
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H. G., & Campagne, M. M. L. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction*, 10(4), 200–208.
- Bohanec, B. 2009. Doubled Haploids via Gynogenesis. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 35–46). Springer Netherlands.
- Bonet, F. J., Azbaid, L., & Olmedilla, A. 1998. Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? *Protoplasma*, 202(3–4), 115–121.
- Bouharmont, J. 1977. Cytology of Microspores and Calli After Anther Culture in *Hordeum Vulgare*. *Caryologia*, 30(3), 351–360.
- Brink, R. A., & Cooper, D. C. 1947. The endosperm in seed development. *The Botanical Review*, 13(9), 479–541.
- Camadro, E. L., Carputo, D., & Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(7), 1369–1376.
- Carputo, D., Barone, A. 2005. Ploidy level manipulations in potato through sexual hybridisation. *Annals of Applied Biology*, 146(1), 71–79.

- Cribb, P. J., & Hawkes, J. G. 1986. Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies *andigena*. *Solanaceae: Biology and Systematics*, 383–404.
- Datta, S. K. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, Vol. 89, 1870–1878.
- De Jong, H., & Rowe, P. R. 1971. Inbreeding in cultivated diploid potatoes. *Potato Research*, 14(2), 74–83.
- De Maine, M. J. 2003. Potato haploid technologies. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 241–247). Springer Netherlands.
- Doleel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. n.d. Flow Cytometry with Plants: An Overview. In *Flow Cytometry with Plant Cells* (pp. 41–65). Weinheim, Germany: Wiley
- Dunwell, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377–424.
- Dunwell, J. M. 1986. Pollen, ovule and embryo culture, as tools in plant breeding. *Plant tissue culture and its agricultural applications*, 375–404.
- Dunwell, J. M. 1981. Influence of Genotype and Environment on Growth of Barley Embryos in vitro. *Annals of Botany*, 48(4), 535–542.
- Dunwell, J. M., & Sunderland, N. 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*, 22(2), 317–323.
- Flegr, J. 2007. Úvod do evoluční biologie. *Academia*.
- Foroughi-Wehr, B., Friedt, W., & Wenzel, G. 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 62(3), 233–239.
- Foroughi-Wehr, B., Wilson, H. M., Mix, G., & Gaul, H. 1977. Monohaploid plants from anthers of a dihaploid genotype of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*, 26(2), 361–367.
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8), 368–375.
- Gavrilenko, T., Thieme, R., & Rokka, V.-M. 2001. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(2–3), 231–239.
- Germanà, M. A. 2009. Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 241–263). Springer Netherlands.
- Germana, M. A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283–300.

- Gonzalez-Medina, M., & Bouharmont, J. 1978. Experiments on anther culture in barley. Influence of culture methods on cell proliferation and organ differentiation. *Euphytica*, 27(2), 553–559.
- Hanneman, R. E. 1994. Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica*, 74(1–2), 19–25.
- Hawkes, J. G. 1990. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press.
- Hawkes, J. G. 1994. *Origins of cultivated potatoes and species relationships*. CAB International.
- Heberle-Bors, E. 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theoretical and Applied Genetics*, 71(3), 361–374.
- Hijmans, R. J., Jacobs, M., Bamberg, J. B., & Spooner, D. M. 2003. Frost tolerance in wild potato species: Assessing the predictivity of taxonomic, geographic, and ecological factors. *Euphytica*, 130(1), 47–59.
- Hijmans, R. J., & Spooner, D. M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*, 88(11), 2101–2112.
- Huamán, Z., & Spooner, D. M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany*, 89(6), 947–965.
- 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(2), 101–112.
- Chase, S. S. 1963. Analytic Breeding In *Solanum tuberosum* L. – a scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 5(4), 359–363.
- Irikura, Y. 1975. Induction of haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. *Potato Research*, 18(1), 133–140.
- Irikura, Y., & Sakaguchi, S. 1972. Induction of 12-chromosome plants from anther culture in a tuberous *Solanum*. *Potato Research*, 15(2), 170–173.
- Johansson, L., Andersson, B., & Eriksson, T. 1982. Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Physiologia Plantarum*, 54(1), 24–30.
- Kasha, K. J. 1974. *Haploids in higher plants: advances and potential*. The Office of Continuing Education, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Keller, W., & Stringham, G. 1978. Production and utilization of microspore-derived haploid plants. *Frontiers of Plant Tissue Culture*, 113–122.

- Kohlenbach, H. W., & Geier, T. 1972. Embryonen aus *in vitro* kultivierten antheren von *Datura meteloides* dun., *Datura wrightii* regel und *Solanum tuberosum* L. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 67(2), 161–165.
- Kumlay, A. M., Ercisli, S. 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29:6, 1075-1084, DOI: 10.1080/13102818.2015.1077685
- Larrosa, F. H., Maune, J. F., Erazzú, L. E., & Camadro, E. L. 2012. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. *Plant Biology*, 14(1), 223–233.
- Maheshwari, S. C., Rashid, A., & Tyagi, A. K. 1982. Haploids from Pollen Grains – Retrospect and Prospect. *American Journal of Botany*, 69(5), 865–879.
- Maluszynski, M. Ed.. 2003. *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Springer Science & Business Media.
- 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*, 56(417), 1711–1726.
- Mendiburu, A. O., Peloquin, S. J., & Mok, D. W. S. 1974. *Potato breeding with haploids and 2n gametes*. University of Wisconsin.
- Mix, G. 1983. Production of dihaploid plantlets from anthers of autotetraploid genotypes of *Solanum tuberosum* L. *Potato Research*, 26(1), 63–67.
- Nitsch, C. 1981. Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In *Plant Tissue and Culture* (pp. 241-252).
- Nitsch, C. 1977. Culture of isolated microspores. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 268-278.
- Nitsch, C., & Norreel, B. 1973. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxiz* cultivate dans l'anthere ou isole de l'anthere. *Academy Science Paris*, 276, 303–306.
- Novák, J., Skalický, M. 2012. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788087415535.
- Ortiz, R., & Ehlenfeldt, M. K. 1992. The importance of Endosperm Balance Number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica*, 60(2), 105–113.

- Ovchinnikova, A., Krylova, E., Gavrilenko, T., Smekalova, T., Zhuk, M., Knapp, S., & Spooner, D. M. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *Petota*: *Solanaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(2), 107–155.
- Pandey, K. K. 1962. Interspecific Incompatibility in *Solanum* Species. *American Journal of Botany*, 49(8), 874–882.
- Petolino, J. F., & Thompson, S. A. 1987. Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(2), 284–286.
- Powell, W. 1990. *Environmental and Genetical Aspects of Pollen Embryogenesis* (pp. 45–65). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Preťová, A. 1995. *Embryogenéza vyšších rastlín v in vitro podmienkach* (pp. 107–114). VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. Bratislava.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. et al. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha. 460 s. ISBN: 8020005862.
- Reinert J, Bajaj YPS. 1977. Anther culture: haploid production and its significance. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer, Berlin, pp 251–267
- Ramanna, M. S., & Hermsen, J. G. T. 1974. Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*. *Euphytica*, 23(2), 423–427.
- Ramaswamy, O., Pal, S., Guha-Mukherjee, S., & Sopory, S. K. 1984. Correlation of glyoxalase I activity with cell proliferation in *Datura* callus culture. *Plant Cell Reports*, 3(3), 121–124.
- 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.
- Rokka, V. M. 2003. Anther culture through direct embryogenesis in a genetically diverse range of potato (*Solanum*) species and their interspecific and intergeneric hybrids. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 235–240). Springer Netherlands.
- Sari, N., Abaka K. and Pitrat M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.). - *Scientia horticultrae* 82: 265-277
- Sedláková, V. 2010. *Tvorba a molekulární detekce somatických hybridů bramboru s vyšší odolností k plísní 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. *The Botanical Review*, 76(3), 377–404.

- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119–1132.
- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134(1), 1–12.
- Seguí-Simarro, J. M. & F. Nuez. 2005. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany* 58: 1119–1132.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519–534.
- Sharma, A. K., & Sharma, A. 2014. *Chromosome techniques: theory and practice*. Butterworth-Heinemann.
- Smýkal, P. 2000. Pollen Embryogenesis – The Stress Mediated Switch from Gametophytic to Sporophytic Development: Current Status and Future Prospects. *Biologia Plantarum*, 43(4), 481–489.
- Song, Y. S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G., & Schwarzfischer, A. 2005. Mapping of extreme resistance to PVY (Ry sto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(5), 879–887.
- Sopory S., Munshi, M. 1996. Anther culture. In *In vitro haploid production in higher plants* (pp. 145-176). Springer, Dordrecht.
- Sopory, S. K. 1977a. Development of Embryoids in Isolated Pollen Culture of Dihaploid *Solanum tuberosum*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 84(5), 453–457.
- Sopory, S. K. 1977b. Differentiation in Callus from Cultured Anthers of Dihaploid Clones of *Solanum tuberosum*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 82(1), 88–91.
- Sopory, S. K. 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. *Canadian Journal of Botany*, 57(23), 2691–2694.
- Sopory, S. K., Maheshwari, S. C. 1976. Development of pollen embryoids in anther culture of *Datura innoxia*. I. General observations and effects of physical factors. *J Exp Bot* 27:49–57
- Sopory, S. K., Jacobsen, E., & Wenzel, G. 1978. Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. *Plant Science Letters*, 12(1), 47–54.

- Sopory, S. K., & Rogan, P. G. 1976. Induction of Pollen Divisions and Embryoid Formation in Anther Cultures of some Dihaploid Clones of *Solanum tuberosum*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 80(1), 77–80.
- Sopory, S. K., Tan, B. M. 1979. Regeneration and cytological studies of anther and pollen callus of dihaploid *Solanum tuberosum*. *Z Pflanzenzticht* 82:31 – 35
- Spooner, D. M. 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: An example in wild potatoes. *American Journal of Botany*, 96(6), 1177–1189.
- Spooner, D. M., & Hijmans, R. J. 2001. Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000. *American Journal of Potato Research*, 78(4), 237–268.
- Spooner, D. M., Nunez, J., Rodriguez, F., Naik, P. S., & Ghislain, M. 2005. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6), 1020–1026.
- Spooner, D. M., Núñez, J., Trujillo, G., Herrera, M. del R., Guzmán, F., & Ghislain, M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19398–19403.
- Stuart, D. A., Strickland, S. G., & Walker, K. A. 1987. Bioreactor production of alfa somatic embryos. *HortScience* (USA).
- Suková, E. 2016. Androgeneze a její využití pro účely vzdálené hybridizace bramboru (Bakalářská práce), Praha, s.52, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra genetiky a šlechtění.
- Sunderland, N. 1971. Anther culture: a progress report: Science Progress. *Science Reviews* 2000 Ltd.
- Sunderland, N. 1973. Pollen and anther culture. *Plant tissue and cell culture* (HF Street, ed.)(pp. 205-239). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Sunderland, N, Dunwell, J. M. 1977. Anther and pollen culture. In: Street HE (ed) *Plant tissue and cell culture*. Oxford, Blackwell, pp 223–265
- Sunderland, N., Evans, L. J. 1980. Multicellular Pollen Formation in Cultured Barley Anthers. *Journal of Experimental Botany*, 31(2), 501–514.
- Telmer, C. A., Simmonds, D. H., & Newcomb, W. 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 84(3), 417–424.

- Teparkum, S & Veilleux, R. E. 1998. Indifference of potato anther culture to colchicine and genetic similarity among anther-derived monoploid regenerants determined by RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 49–58
- Touraev, A., Forster, B. P., & Jain, S. M. Eds. (2009). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht, Springer Netherlands.
- Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. 1996a. Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports*, 15(8), 561–565.
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. 1996b. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*, 9(4), 209–215.
- Touraev, A., Lezin, F., Heberle-Bors, E., & Vicente, O. 1995. Maintenance of gametophytic development after symmetrical division in tobacco microspore culture. *Sexual Plant Reproduction*, 8(2), 70–76.
- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35, 53–109.
- Touraev, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2(8), 297–302.
- Uhrig, H. 1985. Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*, 71(3), 455–460.
- van Breukelen, E. W. M., Ramanna, M. S., & Hermsen, J. G. T. 1975. Monohaploids ( $n=x=12$ ) from autotetraploid *Solanum tuberosum* ( $2n=4x=48$ ) through two successive cycles of female parthenogenesis. *Euphytica*, 24(3), 567–574.
- Vasil, I. 1980. Androgenic haploids. *International Review of Cytology*, 11, 195–223.
- Vokál, B. et al., 2013. Brambory: šlechtění, pěstování, užití a ekonomika. Profi Press, s.r.o. Praha. 160 s. ISBN: 9788086726540.
- Volkov, R. A., Komarova, N. Y., Panchuk, I. I., & Hemleben, V. 2003. Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. *Petota* (genus *Solanum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(2), 187–202.
- Watanabe, K., & Peloquin, S. J. 1991. The occurrence and frequency of  $2n$  pollen in  $2x$ ,  $4x$ , and  $6x$  wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(5), 621–626.



- Watanabe, K. Z. 2002. Challenges in biotechnology for abiotic stress tolerance on root and tubers. *JIRCAS Working Reports*, 23, 75-83.
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E. 2009. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 1–33). Springer Netherlands.
- Wenzel, G., Schieder, O., Przewozny, T., Sopory, S. K., & Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theoretical and Applied Genetics*, 55(2), 49–55
- Wenzel, G., & Foroughi—Wehr, B. 1984. Anther culture of cereals and grasses. In *Laboratory Procedures and their Applications* (pp. 311-327). Academic Press, Inc.
- Zhao, J.-P., Simmonds, D. H., & Newcomb, W. 1996. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta*, 198(3), 433–439.
- Zhao, J., & Simmonds, D. H. 1995. Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 95(2), 304–309.

## 9 Seznam použitých zkratek

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

BA - benzyladenin

BAP - 6-benzylaminopurin

DAPI - 4, 6-diamidino-2-fenylindoldihydrochlorid

GA<sub>3</sub> - kyselina giberelová

IAA - kyselina indolyl-3-octová

IBA – kyselina  $\beta$ -indolyl- $\gamma$ -máselná

KOH - hydroxid draselný

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

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

NAA – kyselina naftyloctová

TDZ - thiadiazuron

RRR – rostlinné růstové regulátory