

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta tropického zemědělství
Katedra tropických plodin a agrolesnictví



Česká zemědělská univerzita v Praze
**Fakulta tropického
zemědělství**

**Indukce polyploidie u Miličky habešské
(*Eragrostis tef*, Zucc., Trotter)
Bakalářská práce**

Vypracoval: Václav Pavlíček

Vedoucí práce: Doc. Dr. Ing. Eloy Fernandez Cusimamani

2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně. Veškeré použité podklady, ze kterých jsem čerpal informace, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a citovány v textu dle normy ČSN ISO 690.

V Praze dne

.....

jméno a příjmení studenta

Poděkování

Děkuji Doc. Dr. Ing. Eloyovi Fernandezu Cusimamani za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost nejen při konzultacích a vypracování této bakalářské práce. Poděkování bych také chtěl věnovat ing. Michaele Hrdličkové a ing. Pavle Zahumenické za pomoc při realizování laboratorních pokusů a jejich věcné rady a připomínky.

Abstrakt:

Eragrostis tef (Zucc., Trotter) je nejdůležitější obilninou tradičně pěstovanou v Etiopii. Vysoký obsah proteinů, dobrá skladovatelnost při změnách podmínek a tradiční chléb injera patří mezi hlavní důvody kultivace. Pěstuje se od nížin po vrchoviny. Mezi hlavní problémy patří poléhávání, výpad zrn z klasu před sklizní, houbové, virové, bakteriální infekce ap.. Chromosomální počet u *E. Tef* je $x=10$, ve dvou kopiích, zdvojený. Tedy $2n=4x=40$. V této práci jsou allotetrapodní rostliny Miličky habešské vystaveny vlivu antimitotického agens oryzalinu v koncentracích od 3,3 mikromol oryzalinu po 240 mikromol za účelem získání polyploidních rostlin ($2=8x=80$). Koncentrace vyšší jak 5 mikromol oryzalinu se ukázaly jako 100% fatální. Z celkové počtu 5100 rostlin bylo získáno 7 jedinců se změněným množstvím genetické informace. Měření bylo prováděno pomocí technologie průtokové cytometrie. Tři rostliny získány při koncentraci 5 mikromol oryzalinu se ukázaly jako mixoploidní, zrno nevytvořily. Zbylé čtyři rostliny získány při koncentraci 3,3 mikromol se ukázaly jako oktaploidní, schopné vytvořit fertilní zrno. Klíčivost se ukázala jako 100%. U oktaploidních rostlin byla zvýšena hmotnost biomasy, množství zrn v klasu, jeho délka, hmotnost tisíce semen či robustnost stébla.

Klíčová slova: Milička habešská, *Eragrostis tef*, polyploidie, oryzalin, *in vitro*, explantátové kultury

Abstract:

Eragrostis tef (Zucc., Trotter) is the most important cereal crop traditionally cultivated in Ethiopia. High amount of protein, good storability (even when conditions are not stable) and traditional bread injera are the reasons why tef is being cultivated. It is cultivated through lowlands to highlands. Main problems of tef cultivation are lodging due to climate conditions, exseeding before spike is mature, viral, bacterial or fungal infection etc. Chromosome number of *E. tef* is $x=10$, $2n=4x=40$. In this study are allotetraploid plants of tef exposed to different concentrations of oryzalin solution. Concentrations starts on highest 240 micromol, decreasing to 3,3 micromol. Intention of this is obtaining polyploid specimens. Concentrations higher than 5 micromol seemed to be 100% fatal. From total 5100 specimens were obtained 7 with changed amount of genetic information. Technology of flow cytometry was used for counting nucleus. Three specimens obtained on concentration 5 micromol were mixoploid, didnt set grains. Four specimens were obtained on concentration 3,3 micromol of oryzalin solution, all octaploid, created fertile grains with 100% germination rate. Octaploid specimens had higher amount of biomass, more grains per spicklet, longer spicklets, HTS or more vigorous stem.

Keywords: *Eragrostis tef*, Williams love grass, polyploidy, oryzalin, *in vitro*, tissue culture

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární review	3
2.1	Eragrosts teff, Milička habešská	3
2.1.1	Morfologie tefu.....	3
2.1.2	Původ a rozšíření	5
2.1.3	Domestikace	5
2.1.4	Hybridizace a její metody.....	5
2.1.5	Biotechnologie.....	6
2.1.6	Explantátové kultury	7
2.1.7	Cytogenetika.....	7
2.1.8	Agronomie, produkční status a ekologie	8
2.1.9	Ekonomie.....	8
2.2	Pšenice jako modelový polyploidní organismus.....	9
2.3	Polyploidizace a metody	11
3	Cíl práce	14
4	Materiál a metodika.....	15
5	Závěr.....	23
6	Reference.....	24

1 Úvod

Milička habešská [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] je obilninou z čeledi Lipnicovitě-*Poaceae*. Čeleď *Poaceae* je čtvrtou největší čeledí kvetoucích rostlin. Čeleď *Poaceae* se dále dělí do podčeledí, a to *Panicoideae*, *Oryzoideae*, *Bambusoideae*, *Pooideae*, *Chloridoideae* a *Arundinoideae* (Kellogg, 1998). Krom tefu tato čeleď zahrnuje hlavní celosvětové obilniny jako jsou pšenice, rýže, ječmen, žito, čirok apod. Další plodina celosvětově důležitá plodina patřící do této čeledi je cukrová třtina. Dobré porozumění této čeledi je důležité pro dostatečné zásobení lidstva základní potravou.

Mezi hlavní problémy vyskytující se u čeledi *Poaceae* jsou houbová a virová napadení, poléhávání, napadení škůdci, pozdní dozrávání či horší kvalita zrn na úkor kvanitity.

Pěstování obilnin bude čelit v blízké době výzvě v podobě vzrůstající celosvětové populace a jejích nároků na výživu. Obilniny tvoří hlavní část nutričního příjmu v celosvětovém měřítku.

Rod *Eragrostis* obsahuje zhruba 350 druhů, primárně původem z tropických a subtropických oblastí. Z nich je 14 endemických v Etiopii. Tef je jediným zástupcem svého rodu pěstovaným pro svá zrna. Občas se konzumují i druhy jako *Eragrostis cilianensis* (F.T.Hubb.), *Eragrostis ciliaris* (L. R.Br.), *Eragrostis curvula* (Schrad., Nees), *Eragrostis cylindriflora* (Hochst.), *Eragrostis gangetica* (Roxb., Steud.), *Eragrostis pilosa* (L.P. Beauv.), *Eragrostis tremula* (Steud.) a *Eragrostis turgida* (Schumach.). Tyto druhy se konzumují především v období nedostatku potravy (Yifru T. & Tefera H., 2005).

Tef je dobrým zdrojem minerálů, především vápníku a železa (Yifru T. & Tefera H., 2005). Kupříkladu dobytek raději spásá posklizňové zbytky tefu nežli jiných obilnin. Jeho kvalita je porovnatelná s čerstvou pastvou (Ketema S., 1997).

Lidská snaha o zlepšení vlastností kultivovaných plodin sahá zhruba 10 000 let do minulosti. Hybridizační programy se snaží vyprodukovat kultivary, které jsou adaptabilnější bez nutnosti zvýšení agronomických zásahů, s vyšším obsahem prospěšných látek (například u kukuřice jsou v dnešní době kultivary pěstované kvůli vysokému obsahu sacharosy - *Zea mays* cv. *Saccharosa*, vysokému obsahu proteinů apod.) či kvůli zvýšené rezistenci vůči patogenům. Kombinací existujících znalostí a zdrojů v kombinaci s moderními biotechnologiemi máme možnost studovat biochemické, fyziologické, genetické vlastnosti v komplexním rozměru.

Současný vědecký výzkum pokládá za hlavní výzvu přečtení genomu pšenice a modelových organismů, jako jsou rýže či *Arabidopsis* (Jauhar, 2006; Dubcovský & Dvorak, 2007).

V Etiopii je tef ceněn více nežli ostatní obilniny. Je to kvůli vysokému obsahu proteinů, a to 9 až 11 procent, což je o trochu více nežli u ostatních obilnin (Mengesha M. K., 1965; Bekele E. & Lester, 1981; Bultosa G., 2007). Dle studie Alemayehu Areda (1995) má tef dokonce 11 až 12,5 procenta proteinů. Divocí předci moderních obilnin přežili do dnešních dob miliony let za pomoci genetické obrany před živelnými a neživelnými vlivy. Tyto původní druhy jsou důležitým zdrojem genetické informace pro moderní výzkum molekulární biologie a pro další hybridizaci standardními způsoby (Raupp & Manhattan, 2007).

Tef stejně jako pšenice spadá do třídy *Liliopsida*, řád *Poales*, čeleď *Poaceae*. Naproti tomu spadají do odlišných podčeledí, tef do podčeledi Chloridodeae, rodu *Eragrostis*, pšenice do podčeledi *Pooideae*, rodu *Triticum* (Smale *et al.*, 1996). Jsou to především sezonní samosprašné traviny. V závislosti na rodu a odrůdě se hybridizace s jinými odrůdami objevuje ve frekvenci do 0,1 u pšenice (Waines & Hegde, 2003). Obecně jsou považovány hodnoty 0-0,02 za přijatelné. U Miličky habešské je míra hybridizace velmi nízká, obecně do 0,01. Tef je původem z Etiopie, kde je také primárně kultivován. Je to C4 rostlina. Mimo několika studií tef nebyl doposud podroben možnostem moderních biotechnologických nástrojů (Yifru T. & Tefera H., 2005; Yu *et al.*, 2007). To bychom rádi změnili touto studií pomocí antimitotického agens oryzalinu.

2 Literární review

2.1 Eragrosts teff, Milička habešská

Tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] je allotetraploidní rostlina ($2n = 4x = 40$), původní v Etiopii. Rod *Eragrostis* je v Africe zastoupen 43% druhy rodu, 18% druhů je z Jižní Ameriky, 12% z Asie, 10% z Austrálie, ve střední Americe je původních 9%, v Severní Americe 6% a nakonec v Evropě 2% (Costanza, 1979). Z 54 druhů zaznamenaných na území Etiopie je 14 druhů (26%) endemitních. (Cufodontis, 1974). Množství druhů z rodu *Eragrostis* nalézajících se na území Etiopie, v porovnání s ostatními lokalitami výskytu, značí původ tefu a jeho následnou domestikace právě zde, v Etiopii (Vavilov, 1951). Přesné vyznačení lokality a období počátku domestikace nebylo doposud jistě rozluštěno.

2.1.1 Morfologie tefu

Tef je sezonní trsovitá travina s jemnými stonky. Koření mělce, s vytvořením širokého podpovrchového kořenového systému. Výška rostliny v závislosti na kultivaru, pěstebních podmínkách je 50-200 cm (Stallknecht *et al.*, 1993). Stonek je většinou vzpřímený. Květenství je formě laty, HTS je 0,3-0,4g Květy jsou oboupohlavní. Každý květ má tři tyčinky. Pestíky jsou velké zhruba 0,5mm, tvořeny dvěma buňkami. Semeník obsahuje dvě blizny. Zrna mají oválný až elipsoidní tvar, od barvy žluto-bíle přes tmavě hnědou. Dle Stallknecht *et al* (1993) či Tadesse Ebba (1975) mohou mít zrna tefu barvy mléčně bílou až temně rudou, nejpopulárnější jsou zrna barvy bílé, dále rudé a hnědé.

Vegetační fáze se dělí na několik fází. První je klíčení, další je fáze prvního pravého listu, odnožování a tvorba vegetačního vrcholu, předělování stébla, metání, kvetení, naplňování zrna a nakonec zralost. Semena je potřeba skladovat při nízkých teplotách a nízké vzdušné vlhkosti, jinak hrozí napadení patogeny, snížení schopnosti klíčení semene či naprosté neklíčivosti. Při dodržení správných skladovacích procedur má semeno životnost zhruba deset let. Obvykle se používá osivo čerstvé, tj. z loňské sklizně.

Kořenový základ je od semene většinou oddělen internodem, délka internodu je závislá na hloubce setby. Po vyražení koleoptylu na povrch se vytvoří první pravý list. Tvorba nových listů je jeden list za čtyři až pět dní. Obvyklý počet listů na stéble je 8-11. Větší počet listů mívají zpravidla pozdní odrůdy.

Po vyklíčení a nárůstu prvního pravého listu následuje odnožování. Jedná se o důležitou fázi při vegetaci rostliny, dochází k zahuštění oseté plochy, čímž se

minimalizují vstupní náklady a maximalizuje efektivita využití plochy. Intenzita odnožování závisí jak na genetických, tak na vnějších faktorech. Růst odnoží je úzce spjat s vyrůstáním listu na hlavním stéble. Odnože se mohou tvořit v místě růstu prvního pravého listu. Za obvyklých pěstebních podmínek vytvoří rostlina tři odnože, na jedno hlavní stéblo, ne každá vytvoří klas, či je schopen plně dozrát. Při nedostatečně oseté ploše mají rostliny tendenci tvořit sekundární odnože. Nejproduktivnější z hlediska zrn jsou odnože objevující se v období tvorby čtvrtého až šestého listu. Odnože objevující se po vytvoření šestého listu většinou nevytvoří klas, odnože objevující se před tvorbou třetího listu vytvoří vlastní kořenový systém a jsou produktivní. Množství růstu odnoží je ovlivněno jak odrůdou, tak podmínkami. S vzrůstajícími stresovými podmínkami se počet odnoží bez klasu zvyšuje, stejně jako zmenšuje velikost a množství zrna na hlavním stéble. V průběhu růstu odnoží se na hlavním klasu stejně jako na odnožích objevuje mikroskopický základ klasu. Tato fáze se nazývá inicializace klasu.

Tabulka 1: Složení zrn tefu na 100g

složka	hmotnost
voda	11g
protein	9,6g
tuk	2,0g
karbohydráty	73g
vláknina	3g
Vápník	159mg
Hořčík	170mg
Železo	5,8mg
Zinek	2mg
Thiamin	0,3mg
Riboflavin	0,2mg
Niacin	2,5mg
Askorbová kyselina	88mg

(Protologue, 1918; Mengesha M. K., 1965; Bultosa G., 2007).

2.1.2 Původ a rozšíření

Kultivace tefu byla primárně záležitostí území Etiopie a některých výše položených končin Eritrey, či severu Keni. Malé, komerčně orientované farmy lze také nalézt v Jižní Africe, Spojených Státech, Kanadě, Austrálii, Evropě (Holandsko) a Yemenu (Costanza *et al.*, 1979). Tef je také pěstován jako pastva, například v Jižní Africe, Maroku, Austrálii, Indii či Pákistánu (Evert *et al.*, 2008).

2.1.3 Domestikace

Tef je pravděpodobně odvozen od blízkého příbuzné *Eragrostis pilosa*, který je tetraploidní ($2n = 4x = 40$), sezonní stejně jako tef s kosmopolitním rozšířením (Ingram and Doyle, 2003).

Předchozí studie naznačovaly původ tefu možný ve čtrnácti divokých druzích *Eragrostis* (Ingram & Doyle, 2003). Dle těchto autorů, v současné době panuje konsensus mezi různými studii zkoumajícími původ tefu, předkem tefu je *Eragrostis pilosa* jako hlavní kandidát. *Eragrostis heteromera* je dalším druhem, považovaným za možného původce genomu tefu. Plastidové DNA sekvenování pěti různých variet tefu a čtyř *Eragrostis pilosa* bylo z části identické, z čehož plyne otázka nad vícerodruhovým původem těchto polyploidů (Ingram & Doyle, 2003). *Eragrostis tef* (Zucc., Trotter) má synonymní označení *Poa abyssinica* (Jacq.) či *Eragrostis abyssinica* (Jacq.). V některých afrických zemích je tef nazýván „gewone bruin tef (ou bruin)“, v arabských tahf, v anglických tef či teff, Williams love grass, v Etiopii tafi (jazyky Oromo/Afar/Sodo), tafe-e (jazyk Had), t'ef, teff taf (jazyky Amaringa a Tigringa), francouzsky mil éthiopien (Yifru T. & Tefera H., 2005).

2.1.4 Hybridizace a její metody

První studii na křížení tefu provedl v roce 1975 Tareke Berhe, který vyvinul metody křížení tefu. V minulosti snahy o hybridizaci a vyvinutí metod nevedly k valným výsledkům, naproti snaze byl úspěch minimální. (Berhe T. & Miller, 1978; Berhe T. *et al.*, 1989). Naproti tomu se v nedávné době program vysoce orientovaný na zákazníka pokusil vyvinout odrůdu tefu ve spolupráci s místními farmáři v Etiopii. Hlavními benefity tohoto programu jsou: cílená hybridizace, selekce v raném stádiu rostlin, testování na odlišných lokalitách, selekce několika kultivarů na základě zkušeností místních farmářů, s následným využitím již existujících právních procedur k vypuštění na trh (Belay *et al.*, 2007). Množství biomasy a hmotnost tisíce semen byly vyšší u nových kultivarů, lineárně korelující

se stářím rostliny, pozitivně ve vysoké míře ovlivňující množství zrn. Počet spikletů na klas je také vyšší, pozitivně korelující s vyšší sklizní. Zlepšení výšky rostliny, délky klasu, množství zrn v klasu jsou vlastnosti rostlin většiny moderních genotypů (Yifru T. & Tefera H., 2005).

Zlepšování vlastností tefu bylo především závislé na masové selekci z krajinné kultivace, z čehož bylo vyselektováno následně několik variet (Yu *et al.*, 2007). Hybrid mezi *Eragrostis tef* a *E. cilinensis* je schopen vytvořit semena, leč nejsou fertillní (Tavassoli, 1986). Toho by se teoreticky dalo vyvarovat pomocí záchranných *in vitro* metod. Dle Likyelesh Gugsu *et al.* (1999) hybrid mezi *Eragrostis tef* a *E. Pilosa* (30-5) je schopen vytvořit semena pouze ve 25% případech, obzvláště jsou-li jako samičí orgány použity pestíky divokých poddruhů *E. Pilosa*. Dle studie Hailu Tefera *et al.* (2003) byl zaznamenán úspěch s mezidruhovým křížením *E. Tef* cv. *Kaye Murri* a *Eragrostis pilosa* (30-5), s podmínkou že dárce pylu byl právě *E. Pilosa*. Více jak dvě stě rekombinativních inbredních linií (RILs) odvozených z rostlin F2 generace křížence *E.tef* cv *Kaye Murri* a *E. Pilosa* (30-5) za použití single seed descend metody bylo dosaženo v Debre Zeit Agriculture Research Center (DZARC) v Etiopii. (Yifru T. & Tefera H., 2005).

2.1.5 Biotechnologie

Biotechnologie se zaměřují na zlepšování vlastností plodin a to ve třech hlavních oblastech: *in vitro* kultury, genetická transformace a analýza pomocí molekulárních markerů (Aulinger, 2002). Objevováním aplikace biochemických a molekulárních markerů se daří zjišťovat nepůvodní části genomu, pomocí čehož docilovat zdvojených haploidních rostlin. Ty zajišťují homozygotnost genů a fenotypovou uniformitu v jedné generaci (Jauhar, 2009).

Pomocí molekulárních markerů je možné zmapovat genom, či jeho části. Restriction fragment length polymorphism (RFLP), simple sequence repeats (SSR), amplified fragment length polymorphism (AFLP), a random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) jsou dominantní merkerové systémy, za pomocí kterých bylo docíleno zmapování části genomu pšenice a tefu (Ayele M. & Nguyen, 2000; Francki & Appels, 2002; Assefa K. *et al.*, 2004; Yaekob A., 2005; Yu *et al.*, 2007; Burger *et al.*, 2008). Pomocí těchto nástrojů se měří genetická diverzita, determinuje fylogenetická příbuznost, zjišťuje přítomnost nepůvodního chromozomu, určuje homolognost či identifikuje kultivar.

2.1.6 Explantátové kultury

Rostlinné tkáňové kultury se kultivují v *in vitro* podmínkách, mohou být kultivovány celé rostliny, či pouze části, semena, embrya, květní pupeny, mikrospory, sporangia, ovaria, jednotlivé buňky, protoplasty apod. Technologie tkáňových kultur má potenciál k regeneraci jakéhokoliv druhu rostliny v laboratorních podmínkách. Vyspělé metody *in vitro* kultur jsou potřeba k aplikaci transgenního materiálu ke zlepšení cereální germoplasmu (Aulinger, 2002; Zhang et al., 2004). *In vitro* gynogense a androgenese jsou důležité technologie pro produkci dihaploidních rostlin jakéhokoliv genotypu (Liu et al., 2002; Raupp & Manhattan, 2007).

Tkáňové kultury jsou také schopny záchrany hybridních emryí, které vykazují znaky špatného vývinu, což může vést až ke smrti potencionálně životaschopného embrya. Toho se dá docílit kultivací embrya na syntetickém mediu (Baum et al., 1992; Shivanna & Ram M., 2005; Sheibani et al., 2007). Také se pomocí explantátových kultur dají vytvořit haploidní jedinci. Například pšenice křížená s *Hordeum bulbosum*, *Sorghum sp.* apod. Centrální snahou v celosvětovém měřítku je implementace nových charakteristik do elitních kultivarů (Baum et al., 1992).

2.1.7 Cytogenetika

Meiosa u tefu a jeho hybridů je těžce vyzorovatelná kvůli přítomnosti dvou buněk v každém pestíku. Tef tvoří meiosu s dvaceti bivalenty (Tavassoli, 1986). Průtoková cytometrie prokázala velikost genomu tefu, 760Mbp, což je srovnatelné s velikostí genomu diploidního čiroku a o zhruba 60% více nežli obsahuje genom diploidní rýže. Tef má také nejmenší chromozomy z čeledi *Poaceae*, jejich velikost je v rozmezí 0,8 až 2,9 mikrometrů, což obecně ztěžuje cytogenetický výzkum tohoto druhu (Yu et al., 2007).

Milička habešská [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] je allotetraploidní rostlina s počtem chromozomů $2n=4x=40$. Většina chromozomů tefu má tvar metacentrický či submetacentrický, několik jich je akrocentrických a jeden či dva páry jsou satelitní. Dvacet bivaventů se standardně tvoří v průběhu diakineze po metafázi-1 po oplození v samičích buňkách. Chromozomální mutace či aneuploidie se u tefu běžně nevyskytují. Molekulární cytogenitické techniky, jako jsou fluerescence či

genomová *in situ* hybridizace by měly být prospěšné při analýze genomu tefu a příbuzných druhů (Gugsa L. et al., 2001)

2.1.8 Agronomie, produkční status a ekologie

Setí tefu vyžaduje jemnou vláčnou půdu, mírně vlhkou, se správným aroma, na omak příjemnou konzistencí. Díky správně připravené půdě lze vytvořit bezpečné lůžko pro vysetí extrémně malých semen Miličky habešské. Tef se vysévá ze dvou důvodů, a to pro produkci zrna, případně produkci biomasy (Stallknecht et al., 1993).

Klíčení semen tefu obvykle trvá 3-12 dní od doby vysetí. Tef klíčí velmi rychle, za předpokladu vysetí do hloubky 1,2 cm. V experimentech provedených Melakem Hailem Mengeshou (1965) vyklíčilo 90% semen při teplotách od 15 do 35 stupňů Celsia, bez výsledku při teplotách pod 10 stupňů Celsia. Dle studie provedené Seufy Ketemou (1997) se klíčení objevuje při teplotách od deseti do dvaceti sedmi stupňů Celsia.

Dělicí část mezi květenstvím a listy není u tefu znatelná, květenství vyrůstá přímo z úžlabiny horního listu bez tvorby elongace internodia. Květy se otevírají v ranních hodinách, mezi 6:45 a 7:45, jako odezva na teplotu a svit. Při tom je také vypouštěn pyl (Stallknecht et al., 1993). Dozrávání semen je v květenství postupné, nejdříve dozrávají vrchní části jak květenství, tak klasů, posléze směrem k bazální části rostliny zbytek. Zralost semen se začíná projevovat zhruba měsíc po opylení. Celkový cyklus od vysetí ke zlaté zralosti je odvislý od kultivaru a pěstebních podmínek, standardně to jsou 2-6 měsíců (Evert et al., 2008). Dle poznatků získaných z National yield trial konaného na různých místech Etiopie, tef roste nejlépe v nadmořských výškách mezi 1800 a 2100 metry, s ročním úhrnem srážek v rozpětí 750 až 850 mm/m², se sezonním úhrnem v rozmezí mezi 450 a 550 mm/m² (Ketema S., 1997).

2.1.9 Ekonomie

Tef je nejvíce preferovanou obilninou městských konzumentů, stejně jako producentů, kteří drží její cenu na nejvyšší cenové hladině v porovnání s ostatními obilninami v Etiopii. Důvodem této preference je zvyk ve výrobě tradičního pokrmu injera, pro svou jemnost, dlouhou trvanlivost, rezistenci vůči kolísání a vzrůstání vzdušné vlhkosti při skladování, nízkým poskladovacím problémům s pesticidy a nemocemi apod. (Ketema S., 1997).

Hlavním způsobem zpracování je rozemletí a následná tvorba tradičního etiopského chleba, injery. Injera je hlavním zdrojem výživy v Etiopii a představuje zhruba dvě třetiny veškerých přijatých živin místními obyvateli (Ingram & Doyle, 2003). Injera se připravuje v různých velikostech, hlavním obložením bývají různé omáčky, založeny na mase či luštěninách.

2.2 Pšenice jako modelový polyploidní organismus

Úrodný Půlměsíc (dnešní jihovýchodní Turecko) je jedním z center původu zemědělství a míst, kde diploidní předci pšenice začaly být kultivovány. Dále se pšenice šířila spolu s rozšiřováním lidských sídel a s osvojováním základních zemědělských dovedností. Pravděpodobně pouze na afro-euroasijské desce (Salamini et al., 2002; Waines & Hegde, 2003).

Tetraploidní pšenice (*Triticum turgidum* var. *Durum*) je původní etiopský druh. Vzhledem k bohaté variabilitě genomu *Triticum turgidum* var. *Durum* v Etiopii je Etiopie považována za centrum diverzity *Triticum turgidum* var. *Durum* (Smale et al., 1996). Rod *Triticum* je v Etiopii zastoupen sedmi druhy – *Triticum diccocum*, *T. durum*, *T. turgidum*, *T. polonicum*, *T. aestivum*, *T. compactum* a *T. pyramidale* (Demissie A. & Habetemariam G., 1991; Tesfaye K., 2000).

Kultivace, opakované sklizení a setí semen divokých trav vedlo skrze selekci a mutaci chtěných znaků (větší zrna, tendence zůstat v klasu do doby sklizení, menší tendence k poléhávání apod.). Vzhledem ke zvýšené hmotnosti zrn domestikovaných jedinců se vytratila schopnost rozšiřovat se dále do krajiny, čímž se omezila propagace zpět do přírody (Waines & Hegde, 2003).

Všechny divoké i domestikované druhy pšenice mohou být rozřazeny do tří skupin. Diploidní *Triticum* ssp. (AA, $2n=2x=14$), tetraploidní *Triticum turgidum* (AABB, $2n = 4x = 28$) a hexaploidní *Triticum aestivum* (AABBDD, $2n = 6x = 42$). Zdroj genomu A je pravděpodobně z *Triticum urartu*, genom B je stále neznám, genom D je *Triticum tauschii* (Smale et al., 1996; Salamini et al., 2002).

Dle Wainese a Ehdaie (2007) je genom B z diploidního druhu rodu *Aegilops*. Evoluce polyploidní pšenice byla vlastně domestikace *Triticum diccoides*. Divoké *T. diccoides* je výsledek hybridizace dvou diploidních trav, a to *Triticum urartu* s druhem rodu *Aegilops*, například *A. searsii* či *speltoides*

Tabulka č. 2: Výše plodie a genom běžných druhů pšenice

Název	Výše plodie	genom
<i>Triticum monococcum</i> ssp. <i>boeoticum</i>	diploidní	AA
<i>Triticum monococcum</i> ssp. <i>monococcum</i>	diploidní	AA
<i>Triticum urartu</i>	diploidní	AA
<i>Aegilops tauschii</i>	diploidní	DD
<i>Triticum dicoccoides</i>	tetraploidní	AABB
<i>Triticum dicoccum</i>	tetraploidní	AABB
<i>Triticum durum</i>	tetraploidní	AABB
<i>Triticum timopheevi</i> ssp. <i>araticum</i>	tetraploidní	AAGG
<i>Triticum spelta</i>	hexaploidní	AABBDD
<i>Triticum aestivum</i>	hexaploidní	AABBDD

Zdroj: Ethiopian and Eritrea flora book (1995), Salamini *et al.* (2002).

Cílené snahy o selektování byly a jsou zaměřeny na produkci nových variet s vyšší výnosností a zvýšenou odolností proti škůdcům, hlísticím, houbovým, bakteriálním či virovým chorobám. Zároveň by však měly prokazovat dostatečnou míru tolerance vůči abiotickým stresovým faktorům jako jsou toxicita těžkých kovů, sucho, odolnost vůči chladu a množství kvalitních zrn, které umožní kvalitní výstup finálního produktu (Tesemma T. & Mohammed J., 1982; Jauhar, 2006; Hulshof *et al.*, 2007). Jako další hybridizační programy na selektování pšenice jsou například snaha o udržení zrn v klasu, zvýšení počtu zrn v klasu, produkce poléhavých odolných variet či zvýšení obsahu lepku, zvýšení efektivity odběru jednotlivých živin, speciálně fosforu a dusíku, introdukce polotrpasličích variet se stejnou výtěžností jako u plně vzrostlých (Tesemma T. & Mohammed J., 1982; Belay G. & Tesemma T., 1990; Raupp & Manhattan, 2007).

Konvenční hybridizační programy jsou schopny převést chtěný znak do zavedené odrůdy během deseti let a déle (Jauhar, 2006). Selektace založená na morfologii, křížení s dalšími domestikovanými druhy jsou primárními konvenčními způsoby hybridizace pšenice.

Rod *Triticum* se dělí na tři stupně plodie, základní počet chromozomů je $x=7$.

Diploidní pšenice má 14 chromozomů ($2n = 2x = 14$), tetraploidní má 28 chromozomů ($2n = 4x = 28$) a hexaploidní druhy obsahují části genomu tří předků, označují se A, B a D ($2n = 6x = 42$). (Fernandes et al., 2000; Waines & Ehdaie, 2007).

Dle studie Getachew Belay et al. (1994) nebyla aneuploidie naměřena u Etiopských genotypů *Triticum turgidum*. Autoři demonstrují, že tetraploidní etiopské genotypy mají pár satelitních, osm mediálních a čtyři submediálních chromosomy. *Triticum aestivum* má submediální chromosomy (Raupp & Manhattan, 2007). Genom *T. aestivum* obsahuje 21 homoeologních chromozomů. Jsou klasifikovány do sedmi homoeologních skupin. Každá skupina obsahuje jeden pár chromozomů z genomu jak A tak B i D (Sears, 1954). Jauhar et al. (2009) dokázaly bližší spojitost mezi genomem A a D nežli mezi ostatními navzájem.

Fáze meiosis je extrémně ovlivnitelná nízkými teplotami pod čtyři stupně Celsia, či k teplotám vysokým, a to nad 25 stupňů Celsia (Smale et al., 1996). Meiotické párování chromosomů u *T. Aestivum* je řízeno genetickými systémy, které zajišťují zrychlení či redukci párování. Párování homoeologních chromosomů je principiálně bráněno aktivitou jediného lokusu (ph) nalézaného na dlouhém rameni chromosomu 5B (Riley, 1972).

Celkový genom pšenice obsahuje 16 000 milionů bází, zhruba 80 procent se objevuje opakovaně, bez kodovaných DNA sekvencí. Dokáže tolerovat většinové chromosomální úpravy a delece. Většina neopakujících se sekvencí genomu pšenice čítá zhruba jeden tisíc nukleotidů volně ložených mezi opakující se sekvence. Je to bezpochyby jeden z největších a nejkomplexnějších genomů mezi všemi plodinami (Francki & Appels, 2002).

2.3 Polyploidizace a metody

Proces allopolyploidizace sehrál důležitou roli při evoluci pšenice, ovsa či tefu. Tyto důležité obilniny se vyvinuly z kombinace dvou a více předků, které harmonicky splynuly v průběhu tisíců let, a to přičiněním jak lidským, tak přírodním (Mergoum, 2004).

Genom pšenice je jeden z nejkomplikovanějších z domestikovaných plodin. Obsahuje více jak 1600MBp DNA. Některé z druhů pšenice jsou diploidní, některé jsou stabilními polyploidy. Základní počet chromozomů je $x = 7$. Rod *Triticum* se dělí na tři stupně ploidie (diploidní $2n = 2x = 14$, tetraploidní $2n = 4x = 28$ a hexaploidní $2n=6x=42$ (Fernandes et al., 2000; Waines & Ehdaie, 2007).

Eragrostis tef je přírodně allotetraploid ($2n = 4x = 40$). Oktaploidní jedinci ($2n = 8x = 80$) byli získáni gynogenickou kulturou. V porovnání s pšenicí má relativně malý genom, pouze 730MBp, základní počet chromozomů je $x=10$ (Gugsa L. et al., 2001; Ingram & Doyle, 2003; Gugsa L. et al., 2006; Yu et al., 2007).

I přesto že konvenční hybridizace zaznamenává úspěchy a stále tvoří nové odrůdy, nejdou ruku v ruce s růstem populace a tím zapříčiněnou zvýšenou poptávkou. Biotechnologie, především genetické inženýrství posouvá hranice hybridizace, cíleným implementováním genu se docilují odrůdy s vlastnostmi nedosažitelnými konvenčními metodami (Jauhar, 2006). Genetické inženýrství se používá především pro minimalizaci ekonomických výdajů při velkoplošné kultivaci *ex situ*. Primárně se snaží docílit rostlin s odolností vůči hmyzu, popřípadě insekticidům, herbicidům apod. Nejvýznamnějšími plodinami na tomto poli jsou rýže (*Oryza sativa* L.), pšenice (*Triticum aestivum* L.), kukuřice (*Zea mays* L.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.) a bavlna (*Gossypium* sp.) (Jauhar, 2006).

In vitro regenerace rostlin je jedním z předpokladů pro úspěšné zvládnutí genetické manipulace, z čehož plyne potřeba efektivního *in vitro* protokolu pro různé explantáty. Biotechnologie pomáhají výzkumníkům v prolomení bariér, které limitují konvenční hybridizační programy (Smale et al., 1996).

Haploidní jedinci mohou být získáni jak v *in-vivo*, tak v *in-vitro* podmínkách, za použití částí samčích či samičích částí rostlin. V *in vivo* podmínkách se dají haploidní jedinci získat pomocí semigamie, polyembrie, chromozomální eliminace, gynogenese a androgenese za extrémně nízké frekvence vzniku haploidních jedinců.

V *in vitro* podmínkách se haploidní jedinci dají získat za pomoci mikrospor (androgenese), semen či semeníku (gynogenese) popřípadě pomocí pylu z jiného druhu (Forster et al., 2007). Produkce haploidních rostlin v *in vitro* podmínkách je nejrychlejší a jediná snadná používaná metoda pro získávání homozygotních linií. *In vitro* kultura z neoplozených semeníků a semen byla úspěšně odvozena od druhů, u kterých se androgenese provádí velmi špatně či vůbec.

Mnoho problémů spojených s androgenesí v *in vitro* podmínkách (jako jsou albinismus, sterilita, neživotaschopnost apod.) se dá zamezit kultivací z neoplozených semen či semeníků. Používají se k indukci haploidních buněk pro vytvoření samičích gamet za účelem tvorby haploidního sporofytu (Shivanna & Ram M, 2005;

Satyanarayana, 2007; Jauhar *et al.*, 2009).

Kultivary pšenice vytvořené ze zdvojených haploidů (dihaploidů) již byly vypuštěny pro pěstování v komerční sféře v Kanadě, Číně, Evropě a Brazílii (Jauhar et al., 2009). V Etiopii byly získáni dihaploidní jedinci tefu a jejich komerční kultivace je ve fázi zkoumání HARC (Bogale T. G., 2010).

V *in vitro* podmínkách je mnohem vyšší pravděpodobnost vzniku spontánních mutací, nežli v podmínkách *in vivo*. To se využívá za pomoci mutagenních agens pro následné získání spontánních mutantů. Krom cíleného implementování určitého genu (PCR, RFLP..) je metoda polyploidie nejjednodušší metodou získání dihaploidních/polyploidních jedinců. Za pomoci antimotických agens se získávají odrůdy s vlastnostmi špatně dosažitelnými konvenčními hybridizačními programy.

Oryzalin je kancerogenní mutagenní látka se sumárním vzorcem $C_{12}H_{18}N_4O_6S$. Používal se široce jako herbicidní látka ze skupiny dinitroanilinů. Působení aktivní látky v herbicidu trvalo 2-8 měsíců primárně na jednoděložné rostliny z čeledi *Poaceae*. Je to sekundární metabolit druhů rodu *Oryza*. Při vyšších koncentracích narušuje depolymerizace mikrotubulů, čímž anisotropicky blokuje růst rostliny. LD 50 se pohybuje kolem 5000 mg/kg. Krom oryzalinu se jako antimotický agens hojně používá colchicin. Alkaloid v přírodě se v toxických koncentracích vyskytující například u *Colchicum autumnale* či u jiných druhů rody *Colchicum*, jen ne v již tak vysokých koncentracích. Je produkován jako sekundární metabolit. Otrava kolchicinem má podobné příznaky jako otrava arsenem. Sumární vzorec colchicinu je $C_{22}H_{25}NO_6$. V medicíně je používán jako léčivo pro kozy.

3 Cíl práce

Hlavním cílem této studie je získat oktaploidní rostliny ($2n=8x=80$) z tetraploidních rostlin ($2n=4x=40$) Miličky habešské (*Eragrostis tef*, Zucc, Trotter) pomocí indukované polyploidizace v *in vitro* podmínkách s použitím oryzalinu jako antimitotického činidla. Polyploidní rostliny v závislosti na velikosti genomu a původní úrovni ploidie mívají vyšší hmotnost tisíce semen, větší objem biomasy, což vede ke zvýšení odběru živin a možnosti zvýšení produkce na hektar. Krásným příkladem je hexaploidní *Triticum aestivum*. V *in vitro* podmínkách je několikanásobně zvýšená pravděpodobnost vzniku spontánních mutací, nežli v *in vivo* podmínkách, čehož se využívá i při této studii. Antimitotický agent oryzalin ovlivňuje dělení v průběhu mitózy, v důsledku čehož dojde ke zdvojení sady původních chromozomů a následné zvýšení ploidie. Toho bychom rádi dosáhli u tefu, pomocí různých koncentrací oryzalinu působících po různou dobu na větší množství čerstvě naklíčených rostlin v *in vitro* podmínkách.

Hypotézy pro cíl práce

- polyploidní rostliny mívají vyšší výnos na základě velikosti genomu a původní úrovně ploidie
- v *in vitro* podmínkách je několikanásobně vyšší pravděpodobnost vzniku polyploidních rostlin nežli v *in vivo* podmínkách
- antimitotický agent oryzalin při použití správné koncentrace po správnou dobu může zvýšit úroveň ploidie rostliny bez následků v podobě sterility
- vzhledem k úrovni ploidie *Eragrostis tef* $2n=4x=40$ je možnost vzniku robustnější polyploidní rostliny

4 Materiál a metodika

Rostlinný materiál byl získán ze sbírek České zemědělské univerzity, Fakulty tropického a subtropického zemědělství. Tři odrůdy tefu (DZ-CR-44, DZ-01-2675, DZ-01-974) byly vysety nejprve v malém množství v *in vitro* podmínkách za účelem zjištění klíčivosti semen. Klíčivost byla téměř stoprocentní. Po zjištění bezproblémového růstu jak na plném Murashige and Skoog mediu, tak na poloviční koncentraci růstového media Murashige and Skoog se započalo s experimentováním s antimitotickým agens oryzalinem. Oryzalin je sekundární metabolit produkovaný rostlinami *Oryza ssp.* Rostliny byly naklíčeny na poloviční koncentraci Murashige and Skoog media, klíčení probíhalo 48 hodin. Dalších 24 hodin trval růst rostlin do velikosti zhruba jeden centimetr, kdy se započalo se samotným pokusem. Rostliny byly přepasážovány zhruba po sto kusech do jednotlivých Erlenmayerových baněk, kde byly zality různými koncentracemi oryzalinu.

Koncentrace nad 5 mikromol po dobu více jak 48 hodin byla ve všech případech 100% fatální. Při kratší době vlivu zalitím roztoku oryzalinu se neprojeví známky polyploidie, pouze větší část rostlin odumřela. Ideální koncentrace se ukázala jako 3,3 mikromol po dobu trvání 24 hodin. V tabulce č.3 jsou patrné výsledky.

Tabulka č. 3: Výsledky mortality rostlin tefu pod různými koncentracemi oryzalinu

Koncentrace oryzalinu, doba trvání	Počet rostlin na danou koncentraci	Mortalita
240 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
240 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
160 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
160 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
80 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
80 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
40 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
40 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
20 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
20 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
10 µmol, 24 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
10 µmol, 12 hodin	500 kusů=0,5 HTS=0,15g	100,00%
5 µmol, 72 hodin	1000 kusů=HTS=0,3 g	100,00%
5 µmol, 48 hodin	1000 kusů=HTS=0,3 g	100,00%
5 µmol, 24 hodin	1000 kusů=HTS=0,3 g	99,97%
3,3 µmol 24 hodin	1000 kusů=HTS=0,3 g	99,96%

U přeživších rostlin byla provedena cytometrická měření. Čtyři rostliny se ukázaly jako oktaploidní, tři jako mixoploidní, zbytek beze změny. Rostliny byly po analýze na flow-cytometru převedeny z *in vitro* podmínek do podmínek *in vivo*. Rostliny v *in vitro* podmínkách byly kultivovány pod světelnou periodou 16/8, s osvětlením 300 lux. Převod byl proved také pod umělým osvětlením, intenzita 5000 lux. 100% vzdušná vlhkost byla v průběhu sedmi dnů postupně snižována na konečných 50% relativní vzdušné vlhkosti.

Kultivace polyploidních rostlin probíhala v nadmořské výšce 439 m.n.m.. Rostliny byly jednotlivě zasázeny do květináčů o objemu 8l, jako substrát byl použit odleželý kompost. Kultivace probíhala v průběhu vegetační sezony v nevytápěném

skleníku. Hnojivo nebylo použito, rostliny byly zalévány dle intervalu vyschnutí substrátu. Na přelomu září a října vzhledem k poklesu teplot byly rostliny převezeny do Botanické zahrady hlavního města Prahy, kde v temperovaném skleníku mohlo zrno bez problému postupně dozrát. Zrno bylo sklizeno v průběhu října až ledna. Mixoploidní rostliny byly od počátku převedeny do *in vivo* podmínek deformované, zrno nevytvořily. Po dozrání semen byla provedena vážení HTS, která jsou patrná v tabulce 4 a 5 níže. Oktaploidní rostliny byly robustnější, s větším množstvím biomasy, vyšším množstvím zrn na klas či právě hts. Výsledky vážení jsou zaznamenané v tabulce 4 a 5.

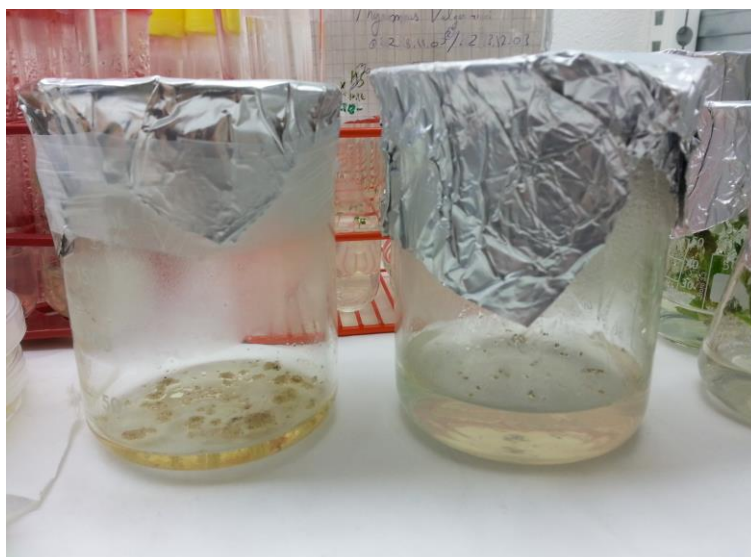
Tabulka č. 4: Množství biomasy, HTS původních rostlin

Odrůda	HTS	Hmotnost biomasy rostliny
DZ-CR-44	0,302 g	19,7 g

Tabulka č.5: Množství biomasy, HTS u získaných polyploidních rostlin

Číslo rostliny	HTS	Procentuelní diference HTS od předlohy	Hmotnost biomasy	Procentuelní diference hmotnosti biomasy
1	0,642 g	212,58%	20,8 g	105,07%
2	0,382 g	126,49%	34,2 g	173,60%
3	0,461 g	152,65%	29,8 g	151,27%
4	0,498 g	164,90%	42,0 g	213,19%

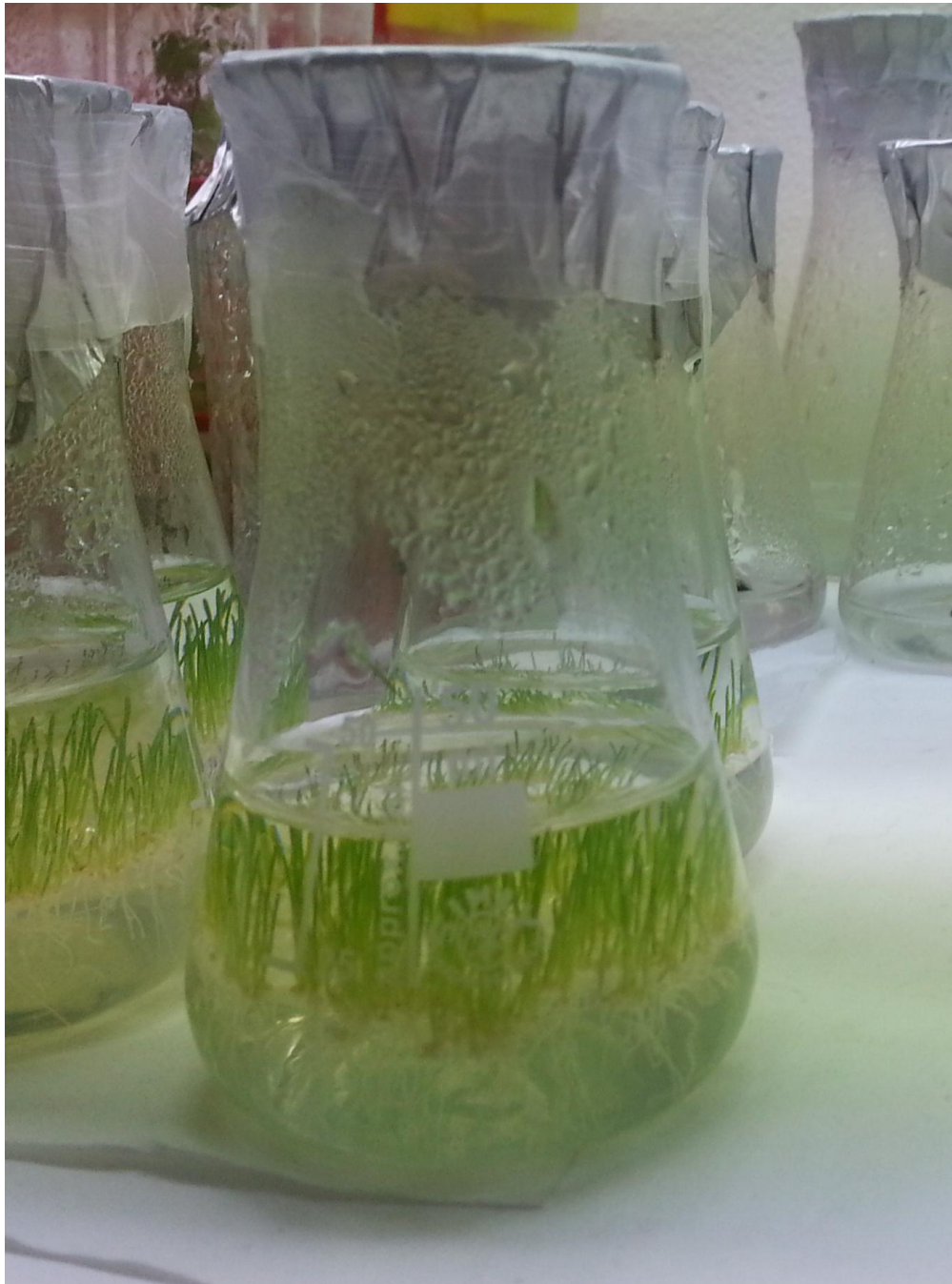
Po sklizení semen byl proveden výsev několika desítek jedinců za účelem kontroly klíčivosti v následující generaci. Klíčivost se ukázala jako 100%.



24 hodin naklíčená semena



Čerstvě převedená rostlina do *in vivo* podmínek



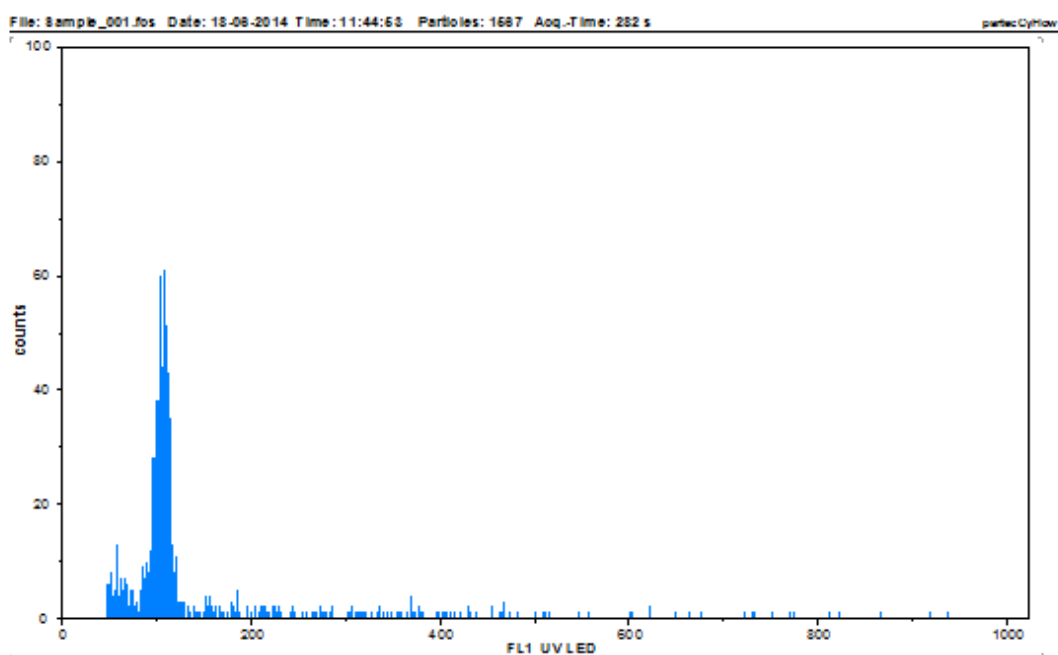
Rostliny zalité roztokem oryzalinu



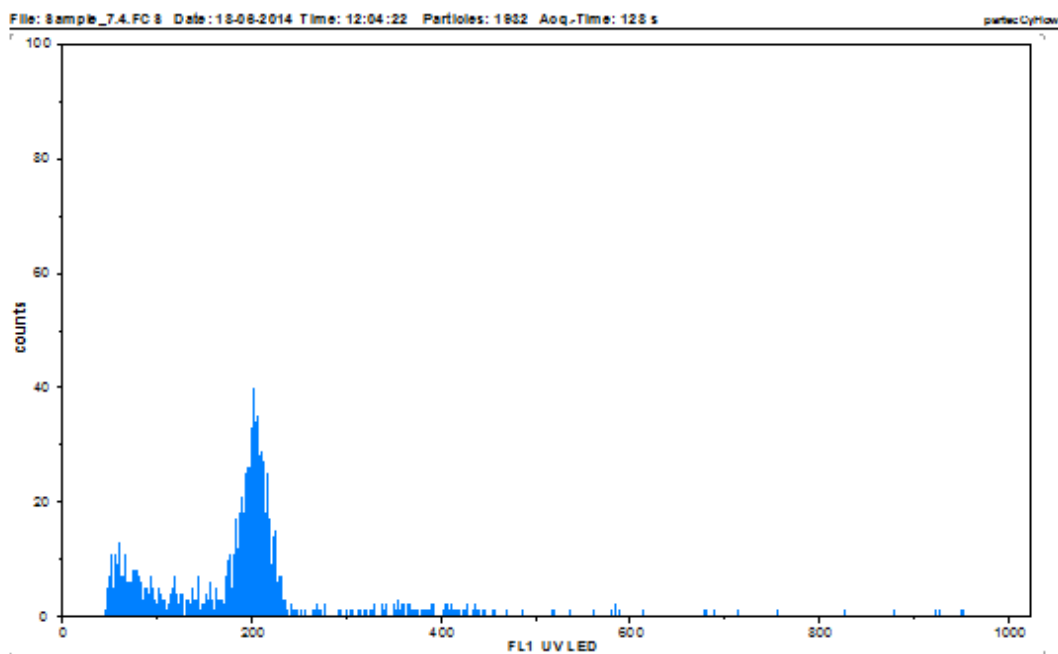
Oktaplovní rostliny



Detailní fotografie klasu, Rostlina č.2



Graf průtokové cytometrie, odrůda DZ-CR-44



Graf průtokové cytometrie, oktaploidní rostliny

5 Závěr

Antimitotický agens oryzalin splnil předpoklad hypotézy o vzniku polyploidních rostlin. Z 5100 rostlin tří různých odrůd (DZ-CR-44, DZ-01-2675, DZ-01-974) se podařilo do fáze zralého semene dopěstovat 4 rostliny odrůdy DZ-CR-44 což odpovídá 0,00078% počtu původních rostlin. Rostliny měly jak vyšší HTS, tak hmotnost biomasy. HTS oktaploidních rostlin odpovídala 126,49 až 212,58% allotetraploidní předlohy. Množství biomasy na jednu rostlinu bylo navýšeno v rozmezí 5,07 až 113,19%. Klíčivost semen oktaploidních rostlin se ukázala jako 100%. Získaná semena, posléze rostliny z polyploidních rostlin bude zapotřebí dále zkoumat a hodnotit.

6 Reference

1. Aulinger E. (2002). Combination of *in vitro* androgenesis and biolistic transformation: an approach of breeding transgenic maize (*Zea mays* L.). A Doctoral Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 115 pp.
2. Areda A. (1995). Protein content of twelve tef genotypes. *Ethiop. J. Sci.* **18**: 221-233.
3. Assefa K. et al. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration in mature seed culture of tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Plan. Cell Reports* **18**:156-158.
4. Baum M. et al. (1992). Wide crosses in cereals. *Ann. Rev. Plan. Physiol. Mol. Biol.* **43**:117–143.
5. Belay G. et al. (1994). Cytogenetic studies in Ethiopian landraces of tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Hereditas* **121**:45-52.
6. Belay G. et al. (1990). Interspecific hybridization in wheat and possibilities of future utilization in wheat improvement in Ethiopia. *Ethiop. J. Agri. Sci.* **12**:9-16.
7. Burger C. et al. (2008). Molecular insights into the evolution of crop plants. *Am. J. Bot.* **95**:113-122.
8. Costanza S. et al. (1979). Numerical taxonomy of *Eragrostis tef*. *Econ. Bot.* **33**:413-424.
9. Cufodontis G. 1974. Enumeration plantarum aethiopiae spermatophyta. *Jard. Bot.*, Brussels.
10. Demissie A. & Habetemariam G. (1991). Wheat genetic resource in Ethiopia . In: Wheat research in Ethiopia . A historical perspective (Gebremariam, H., Tanner, D.G, and Hulluka, M., (eds.)). Addis Ababa , Ethiopia .
11. Dubcovsky J. & Dvorak J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Sci.* **316**:1862-1866.
12. Ebba T. (1975). Tef (*Eragrostis tef*) cultivars: morphology and classification. Part II, Agricultural Experiment Station Bulletin, 66, Addis Ababa University, College of Agriculture, Dire Dawa, Ethiopia.
13. Evert S. et al. (2008). Soil temperature and planting depth effects on tef emergence. *J. Agri. Crop Sci.* **195**:232-236.
14. Fernandes M. et al. (2000). Cytogenetics and immature embryo culture at

- Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Genet. Molec. Biol.* **23**:1051-1062.
15. Francki M. et al (2002). Wheat functional genomics and engineering crop improvement. *Genome Biol.* **3**:3-5.
 16. Jauhar P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding. *Am. Society of Crop Sci.* **46**:1841-1859.
 17. Jauhar P. Et al. (2009). Haploidy in cultivated wheats: Induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci.* **49**:737-755.
 18. Ingram L. et al (2003). The origin and evolution of *Eragrostis tef* (Poaceae) and related polyploids. *Am. J. Bot.* **90**:116-122.
 19. Kellogg E. (1998). Relationships of cereal crops and other grasses. Protecting our food supply: The value of Plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:2005-2010.
 20. Liu W. et al. (2002). Highly efficient doubled-Haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. *Crop Sci.* **42**:686-692.
 21. Mengesha M. H. et al. (1965). Genetic variability and interrelationship of characters in Tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Crop Sci.* **5**:155-157.
 22. Raup & Manhattan (2007). The international collaboration of countries working on sequencing wheat genome. *Ann. Wheat News Letter* vol. **53**, 197 pp.
 23. Riley R. (1972). Cytogenetics of Chromosome Pairing in Wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **69**:912-915.
 24. Salamini et al. (2002). Genetics and Geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Rev. Genet.* **3**:429-441.
 25. Sheibani et al. (2007). Induction of somatic embryogenesis in Saffron using thidiazuron. *Pakistan J. Biol. Sci.* **10**:3564-3570.
 26. Tavassoli A. (1986). The Cytology of *Eragrostis* with special reference to *Eragrostis tef* and its relatives. Ph.D Thesis, University of London, Royal Holloway and Bedford New College. UK.
 27. Vavilov, N.I. (1951). Origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. *Chron. Bot.* **13**:1-366.
 28. Yifru T. & Tefera H. (2005). Genetic improvement in grain yield potential and associated agronomic traits of teff (*Eragrostis tef*). *Euphytica* **141**:247-254.

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Složení zrn tefu na 100g.....	4
Tabulka 2: Výše ploidie a genom běžných druhů pšenice	10
Tabulka 3: Výsledky mortality rostlin tefu pod různými koncentracemi oryzalinu	16
Tabulka 4: Množství biomasy, HTS původních rostlin	17
Tabulka 5: Množství biomasy, HTS u získaných polyploidních rostlin	17

Přílohy:

Složení kultivačního media Murashige and Skoog na jeden litr(1962)

A	NH_4NO_3	16,5 g	100 ml
	KNO_3	19 g	
	CaCl_2	3,3 g	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7 g	
	KH_2PO_4	1,7 g	
B	H_3BO_3	620 mg	10 ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} (\text{H}_2\text{O})$	2,23 g (1,69 g)	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O} (7\text{H}_2\text{O})$	560 mg (1,06 g)	
C	KI	83 mg	10 ml
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25 mg	
D	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg	10 ml
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg	
E	Na_2EDTA	3,72 mg	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78 g	
V	kyselina nikotinová	50 mg	10 ml
	pyridoxin (B6)	50 mg	
	thiamin (B1)	10 mg	
	glycin (aminokyselina)	200 mg	

Přímá navážka do média:

Myoinositol 100 mg

Sacharóza 30 g

Agar 8 g