

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

|

Olomouc 2011

Marie Hamršmíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Aktivita antioxidantních enzymů v průběhu indukce

***in vitro* androgeneze ječmene**

Bakalářská práce

Marie Hamršmídová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Takáč, Ph.D.

OBSAH

OBSAH	3
SOUHRN	4
SUMMARY	5
1 ÚVOD	7
2 CÍLE PRÁCE	8
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
3 PROCES ANDROGENEZE, ZISK HAPLOIDNÍCH ROSTLIN A JEJICH VÝZNAM	10
3.1 VÝVOJ NEZRALÉHO PYLOVÉHO ZRNA - MIKROSPORY	11
3.1.1 <i>Mikrosporogeneze in vivo</i>	11
3.1.2 <i>Přechod od gametofytického ke sporofytickému vývoji</i>	11
3.1.3 <i>Vývoj mikrospor v průběhu androgeneze</i>	12
3.1.4 <i>Androgeneze in vitro</i>	13
3.1.5 <i>Gynogeneze in vitro</i>	14
3.2 ANDROGENETICKÁ INDUKCE, JEJÍ OVLIVNĚNÍ A FAKTORY	15
3.2.1 <i>Genotyp dárcovské rostliny, podmínky jejího růstu</i>	16
3.2.2 <i>Vývojová fáze mikrospory</i>	17
3.2.3 <i>Stresové předošetření</i>	17
3.2.4 <i>Kultivační média a jejich složky</i>	20
3.2.5 <i>Další podmínky kultivace ovlivňující androgenetickou indukci</i>	21
3.2.6 <i>Albinismus</i>	22
3.3 OXIDATIVNÍ STRES	22
3.4 ANTIOXIDAČNÍ SYSTÉM ROSTLIN	27
3.4.1 <i>Superoxiddismutáza</i>	28
3.4.2 <i>Kataláza a její výskyt</i>	30
3.4.3 <i>Peroxidázy</i>	30
3.4.4 <i>Enzymy askorbát–glutathionového cyklu</i>	31
3.4.5 <i>Aktivita antioxidačních enzymů v průběhu androgeneze</i>	32
II. PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 MATERIÁL A METODIKA	34
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	34
4.2 PĚSTOVÁNÍ DONOROVÝCH ROSTLIN	34
4.3 ODBĚR ROSTLINNÉHO MATERIÁLU	35
4.4 IZOLACE PRAŠNÍKŮ	35
4.5 KULTIVACE PRAŠNÍKŮ	35
4.5.1 <i>Působení chladu</i>	36

4.6	STERILIZACE PRAŠNÍKŮ RESPEKTIVE KLASŮ.....	36
4.6.1	<i>Předošetření paraquatem.....</i>	36
4.6.2	<i>Kultivace prašníků.....</i>	37
4.6.3	<i>Regenerace kalusů.....</i>	37
4.6.4	<i>Dopěstování rostlin.....</i>	37
4.7	AKTIVITA ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ.....	37
4.7.1	<i>Extrakce enzymů.....</i>	38
4.7.2	<i>Příprava vzorků pro elektroforézu.....</i>	38
4.7.3	<i>Stanovení obsahu bílkovin v extraktu.....</i>	38
4.7.4	<i>Příprava elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek.....</i>	39
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	<i>IN VITRO KULTIVACE PRAŠNÍKŮ.....</i>	43
5.1.1	<i>Sledování viability prašníků:.....</i>	44
5.1.2	<i>Tvorba kalusového pletiva.....</i>	45
5.1.3	<i>Regenerace kalusů do rostlin.....</i>	48
5.2	<i>IZOZYMOVÉ ANALÝZY.....</i>	49
5.2.1	<i>Superoxiddismutáza.....</i>	50
5.2.2	<i>Kataláza.....</i>	51
5.2.3	<i>Peroxidázy.....</i>	52
5.2.4	<i>Askorbátperoxidáza.....</i>	53
5.2.5	<i>Superoxiddismutáza, kataláza a askorbátperoxidáza v listovém pletivu.....</i>	54
6	DISKUZE.....	56
7	ZÁVĚR.....	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	65
	SEZNAM CHEMIKÁLIÍ.....	67
	SEZNAM TABULEK.....	69
	SEZNAM PŘÍLOH.....	70

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia, s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením vedoucího mé práce, Mgr. Tomáše Takáče, Ph.D.

V Olomouci dne 6. 5. 2011

SOUHRN

Zisk homozygotních linií kulturních plodin se stal významnou součástí šlechtitelských programů. K efektivní produkci těchto rostlin se úspěšně využívá procesu androgeneze, při němž se jeví jako nejvhodnější použití prašnickových kultur či kultur izolovaných mikrospor. Podstata androgenetické indukce spočívá v přeprogramování gametofytické cesty mikrospor na sporofytický způsob jejich následujícího vývoje. Při urychlení či zvýšení efektivity procesu androgeneze hraje roli celá řada faktorů, z nichž je nezbytné zdůraznit genotyp dárcovské rostliny, vývojovou fázi kultivovaných mikrospor nebo použití stresového předošetření.

Cílem práce bylo definovat schopnost indukce androgeneze u dvou linií jarního ječmene s různou rezpozivitou při použití stresového předošetření. V našich experimentech se potvrdila pozitivní úloha stresového předošetření v indukci androgeneze, avšak androgenní odpověď prašnickových kultur u dvou dihaploidních linií jarního ječmene byla zaznamenána i u prašníků bez jakéhokoli předošetření. Efekt použitého předošetření byl silně vázán na použitý genotyp a typ použitého předošetření mohl silně ovlivňovat i viabilitu prašnickových kultur.

Důležitou úlohu sehrává antioxidační odezva rostlin na oxidativní stres, který byl indukován stresovým předošetřením. Současné zvýšení tvorby kalusu a zvýšení aktivity MnSOD po použití paraquatového předošetření, zjištěné v našich experimentech, může naznačovat roli MnSOD v androgenezi. Navíc, indukce SOD mohla způsobit nárůst hladiny peroxidu vodíku, který byl následně odbouráván katalázou, jejíž aktivita byla také zvýšena v přítomnosti paraquatu. Tento mechanismus pravděpodobně podnítil zvýšení indukce androgeneze po paraquatovém předošetření. Z našich výsledků tedy můžeme předpokládat, že androgenní odpověď genotypů je závislá na kapacitě enzymatické degradace reaktivních kyslíkových radikálů v prašnickovém pletivu, do níž se nezapojují peroxidázy.

SUMMARY

The production of homozygous lines of crop plants has become an important part of breeding programs. Homozygous plants could be effectively produced using androgenesis, via anther culture or isolated microspore cultures. The principle of androgenic induction is the reprogramming of microspore from gametophytic to sporophytic development. Many factors influence the effectivity of androgenesis. The most important factors are the genotype of donor plant, microspore developmental stage or stress pretreatment.

The aim of our work was to evaluate the induction capability for androgenesis in two lines of spring barley with different responsivity in response to two different stress pretreatments. The putative role of enzymatic antioxidant defence in this process was investigated.

Stress pretreatment had a positive effect in our experiments on barley androgenesis. However androgenic response was also observed for anthers without pretreatment. The effect of pretreatment was dependent on genotype and type of pretreatment. It affected also the viability of anther cultures.

In addition, our results showed, that enzymatic antioxidant response actively responded to oxidative stress, which was induced by stress pretreatment. Callus production and increased activity of MnSOD associated with the process of androgenesis after paraquat pretreatment. We propose that induction of SOD could lead to an increase of hydrogen peroxide level in anthers which is decomposed by catalase, being also stimulated by paraquat pretreatment. This mechanism probably caused the increase in the induction of androgenesis after paraquat pretreatment. We can assume that the androgenic response of genotypes depends on the capacity of enzymatic degradation of reactive oxygen species in the anther tissues. Based on our findings, peroxidase is not involved in the hydrogen peroxide degradation.

Poděkování

Děkuji Mgr. Tomáši Takáči, Ph.D. za odborné vedení při vypracování bakalářské práce a za čas strávený při získávání a zpracování výsledků experimentální části.

1 ÚVOD

Vlast slovanská slyne ode dávna výtečným ječmenářstvím a sláva plzeňského piva zajisté jen dobrému ječmeni přičítati se může, kdy rozeznávati několika odrůd se dá od ječmene dvou až šesti řad čítající, které zase lišíme podle doby osevní, na jaré a ozimé... Tak je představen ječmen v historické čítance pro obecné školy z roku 1906.

Ječmen (*Hordeum* L.) řadíme mezi lipnicovité do třídy ječmenovitých, jejichž květenstvím je složený klas, ve kterém klásky stojí širokou stranou k větenu a listy ječmene mají ouška (Vančurová a kol., 1966).

Ječmen (*Hordeum* L.) se vyskytuje v druzích jednoletých, dvouletých i víceletých. Jako znak rodu *Hordeum* se jeví složený klas z jednokvětých klásků přisedlých ve výkrojcích větenu po trojicích (Vančurová a kol., 1966). Pluchy zakončují dlouhé, křehké osiny a spolu s pluškou, plucha pevně objímá obilku (Garda a kol., 1967).

Potvrzení Mendlových zákonů položilo základ počátku šlechtění zemědělských plodin, tedy i ječmene. Šlechtění a tvorba nových odrůd ječmene slouží jako podstatný prostředek zvyšující efektivnost a stupeň úrovně zemědělské výroby (Lekeš, 1997).

Pro šlechtitelské programy je mimořádně důležité získání homozygotních linií těchto kulturních plodin. Homozygotní haploidní linie jsou charakterizovány poloviční sadou chromozomů a je možné je vytvořit procesem androgeneze, kdy se vývoj pylového zrna přeprogramuje z gametofytického na sporofytický. V současnosti se potvrzuje, že rozhodujícím faktorem pro přeměrování tohoto vývoje může být stres. Haploidní a dihaploidní rostliny hrají nezaměnitelnou roli ve studiích týkajících se genetických analýz, mapování mutací, genů podílejících se na androgenezi, buněčného dělení, transformaci rostlin a jsou významnou součástí pokroku v rostlinné biotechnologii a molekulární podstatě šlechtění.

Cílem bakalářské práce je testovat indukci androgeneze prašниковých kultur ječmene za použití různých stresových podmínek *in vitro*. Teoretická část se zabývá souhrnem současných poznatků o tématice oxidačního stresu u rostlin a procesu androgeneze. V praktické části jsou pomocí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu porovnány změny ve složení izozymů antioxidantních enzymů při různých podmínkách indukčního stresu.

2 CÍLE PRÁCE

1. Na základě dostupných literárních zdrojů zhodnotit aktuální stav poznatků v tématice oxidačního stresu u rostlin obecně a v souvislosti s vývojovými procesy s důrazem na indukci *in vitro* androgeneze.
2. Zvládnutí metod izolace prašníků ječmene za sterilních podmínek a následná regenerace rostlin ječmene z prašниковých kultur.
3. Mikroskopickými metodami ověřit viabilitu mikrospor a zmapovat průběh dělení jader během androgeneze.
4. Testovat schopnost indukce androgeneze u dvou genotypů při různých podmínkách (použití prašníků bez předpůsobení, použití prašníků po sedmidenním chladovém předošetření, použití prašníků po chemickém působení paraquatu).
5. Zjistit změny ve složení izozymů antioxidantních enzymů pomocí nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu u dvou genotypů s různou schopností indukce androgeneze.
6. Porovnat změny ve složení izozymů antioxidantních enzymů při různých podmínkách indukčního stresu (bez předošetření, chladové předošetření, chemické předošetření).

I. TEORETICKÁ ČÁST

3 PROCES ANDROGENEZE, ZISK HAPLOIDNÍCH ROSTLIN A JEJICH VÝZNAM

Během životního cyklu rostlin se střídá haploidní fáze (gametofyt) s diploidní fází (sporofyt). Zralým samičím gametofytem je zárodečný vak (7-buněčný) obsahující 1 gametu (vaječnou buňku). Zralý samčí gametofyt představuje klíčící pylová láčka obsahující dvě gamety, buňky spermatické.

Ke tvorbě gamet dochází při samčím reprodukčním procesu probíhajícím v tyčinkách, kdy diploidní buňky vstoupí do meiózy a produkují samčí haploidní výtrusy nebo mikrospory. Mikrospory se dále dělí mitoticky a následně se diferencují do mnohobuněčných samčích gamet či pylových zrn. V případě, že je zabráněno vývoji pylu a mikrospora je místo na gametickou, vyslána na sporofytickou „cestu“, dochází k procesu zvanému androgeneze (Datta, 2005). Výsledkem tohoto přeprogramování jsou haploidní (n) androgenní struktury, které se mohou vyvíjet po spontánním či indukovaném zdvojení chromozomů do dihaploidních rostlin (2n) (Zur a kol., 2009). Hlavní výhodou androgeneze je rychlý zisk čistých a úplných homozygotních linií, což usnadňuje výběr fenotypů pro kvalitní znaky (Datta, 2005).

Takto „přeprogramované“ mikrospory jsou tedy vhodným materiálem jak pro studium embryogeneze, stejně tak se dají využít pro transgenozu a mutagenézi. Vznikající dihaploidní linie jsou pak potřebné v mapování a jiných genomických studiích, poskytují řadu možností pro šlechtitelské účely, molekulární a biotechnologické studie (Preťová a kol., 2006, Zur a kol., 2008, 2009). Haploidy je možné použít v segregování haploidní populace pomocí metod délkového polymorfismu restričních fragmentů, zjišťování genetické variability v pohlavním křížení či pro různé genetické modifikace genomu (Preťová a kol., 2006). Obrovský význam v současnosti získaly transgenní rostliny, díky nimž lze studovat příslušné geny podílející se na androgenézi, jejich expresi, translační regulace apod. Homozygotní linie poskytují vzácný unikátní materiál pro genomiku, molekulární podstatu šlechtění a slouží i jako model pro studium buněčného dělení. Mapování dihaploidních populací může objasnit funkci řady genů, které se následně dají využít pro zlepšení regenerace tkáňových kultur. Schopnost transformace a následné regenerace do celistvých rostlin je významnou součástí pokroku v rostlinné biotechnologii (Datta, 2005). Ve srovnání s tradičními technikami šlechtění může systém androgetické indukce ušetřit čas, finanční náklady i pracovní úsilí (Zur a kol., 2008).

3.1 Vývoj nezralého pylového zrna - mikrospory

3.1.1 Mikrosporogeneze *in vivo*

Prašník (anthera) jako součást tyčinky vzniklé metamorfózou listu, se skládá ze 2 prašných váčků, z nichž každý je tvořen 2 prašnými pouzdry. Prašné váčky se spojují konektivem, jímž prochází cévní svazek. Stěny prašníku mají třívrstevnou stavbu tvořenou vnější, střední vrstvou a vnitřním výstelkovým pletivem. Část buněk výstelkového (archesporiálního) pletiva dá vzniknout mateřským buňkám pylových zrn, které pak začnou vytvářet mikrospory (nezralá pylová zrna) (Jurčák, 2007).

Samčí gametogeneze je zahájena rozdělením diploidní buňky za vzniku pylových mateřských buněk. Sporogenní mateřské buňky podstoupí meiotické dělení za vzniku haploidních tetrad. Jednotlivé buňky tetrad jsou pak uvolněny jako samostatné mikrospory a tyto jednojaderné mikrospory, vytvořené meiózou v prašnicích, iniciují asymetrické mitotické dělení, které vede ke vzniku pylu se dvěma jádry (označovanými také jako buňky), větší vegetativní a buňkou menší generativní, která je zcela uzavřena uvnitř buňky vegetativní (McCormick, 1993). Generativní jádro, obklopené jádrem vegetativním, dá vzniknout buňkám spermatickým, které budou mít i ve svém budoucím vývoji blízký vztah k jádru vegetativnímu. Vegetativní jádro se stává základem pro tvorbu pylové láčky. (McCormick, 1993, Maraschin a kol., 2005, Wędzony a kol., 2009). U 70 % rostlinných druhů dochází k druhému mitotickému dělení buňky generativní na dvě buňky spermatické v průběhu růstu pylové láčky. U jiných druhů druhé mitotické dělení nastane ještě před vytvořením pylové láčky (McCormick, 1993, Procházka a kol., 1998). Dvojjaderný pyl se např. u kukuřice mění na trojjaderný právě po rozdělení generativního jádra na dvě samčí gamety. Mikrosporová mitóza je tedy asymetrickým dělením, které vede k rozdílným osudům buňky vegetativní a generativní. Vegetativní jádro další mitózu nepodstoupí a dále pak bude řídit růst pylové láčky a kontrolovat další rozvoj pylového zrna. U generativní buňky však proběhne další mitóza a vzniknou dvě spermatické buňky (McCormick, 1993, Maraschin a kol., 2005, Wędzony a kol., 2009).

3.1.2 Přejít od gametofytického ke sporofytickému vývoji

Mikrospory jsou první generací samčích gametických buněk a vlastní haploidní chromozomovou sadu. Jsou produkovány v prašnicích ve velkém množství, což usnadňuje jejich izolaci a další manipulace s nimi, a mohou být za určitých podmínek předmětem

androgenní indukce (Wędzony a kol., 2009). Každá pylová buňka je vysoce specifická a vykonává specializované biologické funkce, proto je indukce sporofytického vývoje možná pouze v raných fázích vývoje, kdy se buňky gametofytu jeví jako totipotentní. Při androgenezi je pak vyvolán sporofytický růst samčí gametofytické buňky, což vyžaduje komplexní reprogramování vývojového plánu pylu na formace embrya (Wędzony a kol., 2009).

Období vývoje pylu citlivé k androgenezi je zastoupeno fází, ve které dojde k asymetrickému rozdělení jednojaderných mikrospor, jež vyústí ve vznik polarizovaného pylového zrna. Toto pylové zrno pak obsahuje buňku generativní vloženou do cytoplazmy buňky vegetativní. Buňka generativní s malým množstvím cytoplazmy podstoupí další mitotické dělení a vytvoří dvě buňky spermatické, zatímco buňka vegetativní začne akumulovat zásobní látky, hlavně škrob a lipidy a podílí se na dalším vývoji tohoto pylového zrna. Bylo prokázáno, že hromadění škrobu v cytoplazmě vegetativní buňky je znamením, že může být zahájena androgeneze (Maraschin a kol., 2005).

V průběhu androgeneze bylo v pylových zrnech pozorováno opakované buněčné dělení. U kukuřice bylo zaznamenáno, že po vniknutí spermatické buňky do buňky vaječné vymizí jádro této vaječné buňky. Taková buňka obsahující jen haploidní jádro buňky spermatické postupně prochází dělením podobně jako zygota a dává vznik haploidnímu zárodku (Procházka a kol., 1998).

3.1.3 Vývoj mikrospor v průběhu androgeneze

Pylové zrno při kultivaci může reagovat čtyřmi různými způsoby. Jednojaderné pylové zrno se může dělit symetricky, a tak dá vzniknout dvěma stejným dceřiným buňkám, jež obě podstoupí následná dělení (www.molecular-plant-biotechnology.info). Tento proces je doprovázen také reorganizací cytoskeletu, která vede k umístění jádra do centra jednojaderných mikrospor a po transportu jádra daleko od okraje buněk (Smýkal, 2000).

U rostlinných druhů jako je ječmen, pšenice, *tritikale* nebo paprika se jednojaderný pyl rozdělí nerovnoměrně tak, jak to dělá v přírodě, přičemž generativní buňka degeneruje a v důsledku následného dělení vegetativní buňky vzniká kalus nebo embryo (www.molecular-plant-biotechnology.info). Opakované dělení vegetativní buňky vede k rozdělení buňky řadou vnitřních stěn za vzniku buněk somatických. Po jaderném dělení následuje cytokineze za tvorby vícejaderného pro-embrya. Generativní buňka tedy zůstane nerozdělena nebo podstoupí několik po sobě jdoucích dělení, která ovšem nepřispívají

k výsledné formaci embrya. V ječmenu a pšenici toto dělení vegetativní buňky směřuje většinou k tvorbě kalusu spíše než embrya (Smýkal, 2000). U několika málo druhů mohou pylová embrya pocházet z buňky generativní, kdy vegetativní buňka se buď nedělí, nebo se rozdělí jen v omezeném rozsahu. Poslední cestou je nerovnoměrné rozdělení jednojaderných pylových zrn, za tvorby buňky vegetativní a generativní, přičemž se obě buňky opakovaně dělí za účelem přispět k vývoji embrya nebo kalusového pletiva (www.molecular-plant-biotechnology.info, Smýkal, 2000).

3.1.4 Androgeneze *in vitro*

Embryogeneze iniciována přímo z mikrospor se nazývá androgeneze (Smýkal, 2000). *In vitro* kultivovaná mikrospora pro své přežití zablokuje vývoj v pylové zrno a dále se vyvíjí sporofytickou cestou v embryo či regenerovanou rostlinu (Shariatpanahi a kol., 2006). Tato blokáce generativní buňky a další šíření pouze buňky vegetativní při použití dvojjaderných pylových zrn vede během časných fází embryogenního vývoje k změnám genové exprese (Smýkal, 2000). Je-li tedy změněno nebo blokováno asymetrické dělení mikrospor, mikrospory přecházejí z gametofytického vývoje na sporofytickou cestu vývinu za vzniku embryí či kalusových pletiv, které se dále vyvíjejí v haploidní rostliny (McCormick, 1993, Procházka a kol., 1998). Vývoj mikrospor při kultivaci může být přímý za vzniku embrya, které za určitých kultivačních podmínek regeneruje přímo v rostlinu. Nebo druhou možností je regenerace nepřímá za vzniku kalusového pletiva, jenž regeneruje do rostliny pomocí somatického embrya či výhonky. Často obě vývojové cesty regenerace koexistují vzájemně ve stejné kultuře a jejich podíly závisí na genotypu dárcovské rostliny a použitém stavu kultury (Wędzony a kol., 2009).

U embryogenních mikrospor v mikrosporových kulturách kukuřice byla objevena organizace cytoplazmy do hvězdicovitých útvarů, naproti tomu u ječmenných mikrospor s bohatou cytoplazmou byl pozorován zrnitý vzhled s jádrem nacházejícím se v blízkosti buněčné stěny, bez viditelné vakuoly (Preťová a kol. 2006). Tyto organizace mohou sloužit jako morfologické markery pro spouštění procesu androgeneze v embryogenních mikrosporách. Hvězdicovité útvary v cytoplazmě byly popsány u ječmene, pšenice, řepky a tabáku (Maraschin a kol., 2005).

Haploidní rostliny lze však získat kromě pomocí androgeneze i gynogenezí či eliminací sady chromozómů jednoho z partnerů při křížení.

Nejčastěji používanou technikou k zajištění tvorby dihaploidních rostlin jsou prašnickové kultury, v rámci nichž je sledován vývoj mikrospor v průběhu procesu mikrosporové embryogeneze (Wędzony, 2009). Kultury izolovaných mikrospor jsou tedy vhodným materiálem pro studium embryogeneze (Zur a kol., 2008). Dihaploidie umožňují jedinečnou příležitost zkrátit šlechtitelský cyklus plodin a opravit agronomicky nevýhodné znaky pomocí homozygotního stavu, kde lze recesivní znaky nejsnadněji zachytit. Nejžádanějšími variantami dihaploidních rostlin se staly kultivary rýže, pšenice, ječmenu, kukuřice, řepky, bavlny, slunečnice, kávy a tabáku aj. (Datta, 2005). Je však známo, že ne všechny rostliny procesu androgenese podléhají. Vhodným rostlinným materiálem jsou například obilniny, řepka, brambor, len, brukvovité (Datta, 2005, Zur a kol., 2009), ale byly objeveny i druhy zemědělsky významné, které však jsou vůči embryogenezi málo citlivé, nebo dokonce imunní, a to díky nízké androgenní odpovědi či vysoké produkci albinotických regenerovaných jedinců (Muñoz-Amatriain a kol., 2009).

3.1.5 Gynogeneze *in vitro*

U řady zástupců odlišných rostlinných druhů byla popsána indukovaná gynogeneze jako alternativní metoda embryonálního vývoje neoplozeného zárodečného vaku (neoplozené samičí gamety) v kulturách izolovaných vajíček či izolovaných zárodečných vaků (Žárský a Luštinec, 2005). Z části je gynogeneze podobná partenogenezi, jež v přírodě probíhá během apomixie (Wędzony a kol., 2009). Gynogeneze je charakterizována jako vznik haploidních rostlin z haploidních buněk zárodečného vaku, buňky vaječné či synergid (buněk pomocných). Nelze však vyloučit ani vznik haploidů z antipod (buněk protistojných). Tento způsob embryogeneze *in vitro* využívá jako explantáty pestíky, jejich části nebo samotná vajíčka a pro tuto techniku se ujal název gynogeneze. Proces je úspěšný u limitovaných počtů různých druhů rostlin, jako je např. ječmen, cukrovka, pšenice, kukuřice, gerbery, petúnie, topol aj. (Procházka a kol., 1998, Bohanec a kol., 2009). Hraje omezenou roli použití u obilnin a byla indukována u některých genotypů pšenice či rýže. Běžně je využívána u ječmene, kukuřice, moruše, slunečnice nebo cibule (Wędzony a kol., 2009) nebo u rostlinných druhů, u kterých se ostatní techniky navozující tvorbu haploidů ukázaly jako neúčinné (Seguí-Simarro, 2010).

Neprokázal se však pozitivní vliv na indukci gynogeneze stresového předošetření na použité kultury jako je tomu v případě androgenese (Wędzony a kol., 2009).

3.2 Androgenetická indukce, její ovlivnění a faktory

Proces androgeneze je obecně charakterizován 3 překrývajícími se fázemi. První fáze je potlačení gametofytického vývoje vlivem stresových faktorů, což vede k dediferenciaci buněk. Druhá fáze je spjatá s buněčným dělením, při kterém dochází ke vzniku mnohobuněčných struktur a třetí generuje tzv. embrya či kalusové struktury (Maraschin a kol., 2005).

Je nutno zmínit řadu faktorů, které významně ovlivňují efektivitu androgeneze. Nejdůležitějšími a nejvíce prozkoumanými v souvislosti s tímto procesem jsou obilniny, na nichž byla většina faktorů studována. Nejčastěji se studují rostliny jako je ječmen, pšenice, *tritíkale*, kukuřice, rýže, řepa, ale několika pozitivních výsledků bylo dosaženo i u některých druhů zeleniny a ovoce, okrasných dřevin, léčivých druhů (Wędzony a kol., 2009). U rostlinných druhů jako je pšenice, rýže, žito, kukuřice atd. mohou být pylová zrna donucena k produkci kalusu nebo embrya změnou složení média (www.molecular-plant-biotechnology.info). U mnohých druhů je však odpověď a tvorba haploidů velmi nízká a u některých až nemožná např. u luštěnin (Wędzony a kol., 2009). Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) se stal modelovým systémem pro studium vzniku mikrosporové embryogeneze, jež je extrémně závislá na genotypu donorového rostlinného materiálu (Muñoz-Amatriaín a kol., 2009).

Mezi významné faktory patří vliv:

- genotypu dárcovské rostliny (Smýkal, 2000, Datta, 2005, Preťová a kol., 2006, Muñoz-Amatriaín a kol., 2009),
- vliv prostředí, ve kterém se donorová rostlina vyvíjí (Preťová a kol., 2006),
- fáze mikrospory (odlišná pro různé rostliny) (McCormick a kol., 1993, Preťová a kol., 2006, Bohanec, 2009),
- typ předošetření – stresové podmínky (Smýkal, 2000, Zur a kol., 2008, 2009, Jacquard a kol., 2009),
- složení média a fyzikální vlastnosti média (Datta, 2005),
- manipulace s kulturami (např. na médiu) (Datta, 2005),
- podmínek kultivace (Wedzony, 2009).

Na frekvenci indukce může mít vliv i schopnost regenerace zelených či albikátních rostlin a také frekvence spontánních zdvojování chromozomových sad pro vznik dihaploidních rostlin. *In vitro* androgenezi prašnickových kultur ovlivňuje dokonce i množství a hustota kultivovaných prašníků, orientace prašníků na médiu či přítomnost prašnickové nitky, která může na kultivaci působit negativně. Vliv mají i výška či objem kultivačních nádob či použití tuhého a tekutého média. Kultivační podmínky však může omezit i přítomnost jiných pletiv či orgánů v médiu nebo špatně zvolená fotoperioda kultivace (Ohnoutková, 2000).

Mikrosporové dělení a následná regenerace do celistvých rostlin jsou závislé na podmínkách, za kterých se vyvíjela donorová rostlina. Příhodné optimální podmínky růstu, např. s řízenou světelnou periodou, intenzitou teploty, vlhkostí, bez nemocí a škůdců se projeví úspěšnou odpovědí prašnickových kultur na androgenezi (Datta, 2005).

3.2.1 Genotyp dárcovské rostliny, podmínky jejího růstu

Podstatnou roli v androgenní odpovědi hraje genotyp dárcovské rostliny a jeho ovlivnění podmínkami životního prostředí (Smýkal, 2000, Datta, 2005, Preťová a kol., 2006, Muñoz-Amatriaín a kol., 2009, Zur a kol., 2009).

Dokazuje to i transkriptomická analýza tří testovaných dihaploidních linií ječmene (označených DH46, DH6188 a DH6004), které měly podobný genetický základ, avšak rozdílné androgenní potenciály. Studie umožnila identifikovat 213 odlišně exprimovaných genů u těchto linií, jež byly podrobeny 4-dennímu stresovému předšetření pomocí manitolu. Odhalené geny byly zařazeny do skupin podle své funkce a profilů exprese jako např. funkce obrany a ochrany, virulence, geny pro metabolismus, transkripci či transport. Díky studii byly objeveny i geny blízké pro androgenezi jako např. geny kódující proteiny pro transkripci, regulaci translace nebo degradaci pylu, které byly spojeny s vznikem zelených rostlinných regenerantů nebo geny kódující plastidy interagující se vznikem albinotických rostlin (Muñoz-Amatriaín a kol., 2009). Další transkriptomická analýza prokázala, že geny kódující alkoholdehydrogenázy, metaloproteázy FtsH, cystein proteázy, aspartic-proteázy, 26S proteazómovou regulační podjednotku a transkripty zapojené do signalizace či buněčné ochrany jsou spojovány s reakcí na stres a vzájemně se dají počítat mezi biomarkery přeprogramování mikrospor k androgenezi. Všechny tyto geny byly odlišně exprimovány v mikrosporách ječmene, jež byly nebo nebyly indukovány manitolem (Maraschin a kol., 2006).

Existují také údaje o vlivu genotypu na aktivitu enzymů, kdy vyšší androgenetická rezponzivita např. u kultivaru Miezsco byla podmíněna vyšší aktivitou SOD a PEX, v porovnání s méně androgenním kultivarem Wanad. Naopak aktivita CAT nebyla genotypem nijak ovlivněna (Zur a kol., 2009).

Regenerační schopnosti rostlinných druhů jsou tedy geneticky dědičnou vlastností předávanou z generace na generaci. Geny, jež androgenezi řídí jsou součástí složitěho komplexu, do kterého zasahuje i cytoplazmatická dědičnost či repetitivní DNA. Je však zřejmé, že odpověď *in vitro* androgeneze je řízena genetickým potenciálem. Počet genů, které se na androgenezi podílejí je ale velmi malý (Datta, 2005, Zur a kol., 2008). Stále ale chybí ucelený popis tohoto procesu „přepínání“ na molekulární úrovni (Shariatpanahi a kol., 2006).

3.2.2 Vývojová fáze mikrospory

Studie prokázaly, že pylové zrno reaguje na indukci androgeneze pouze v určitém vývojovém stádiu mikrospory. Mnohé výsledky potvrzují, že optimální stupeň vývoje mikrospory pro indukci androgeneze se pohybuje od střední po pozdní fázi jednojaderného stádia. Vhodná kultivační stádia mikrospor se však liší podle rostlinných druhů a značně ovlivňují indukci androgeneze i celkový výsledek regenerace. Pro obilniny se ukazuje jako nejvhodnější použití středního nebo pozdního jednojaderného stádia. Vývojová fáze nám pak může pomoci při určování doby izolace a kultivace (Preťová a kol., 2006). U mikrospor ječmene se jako citlivá udává pozdní fáze jednojaderného pylového zrna (spóry) (Procházka a kol., 1998).

3.2.3 Stresové předošetření

„Přeorientování“ gametofytu na sporofyt k vývoji embrya z haploidní gamety, si vyžaduje stresové předošetření, použité na prašnickové či mikrosporové kultury po několik dní (Preťová a kol., 2006, Jacquard a kol., 2009, Zur a kol., 2009). Existují i případy potvrzující indukci androgeneze bez předošetření (Kruczkowska a kol., 2002, Fehér a kol., 2008). Schopnost mikrospory nebo jiné haploidní buňky dediferencovat a regenerovat do celé rostliny spočívá v působení stresu, kterému byla tato buňka vystavena. Tímto způsobem se získávají dihaploidní homozygotní linie, pro jejichž zisk je nejčastěji používaným systémem mikrosporová embryogeneze s použitím kultur prašníků či izolovaných mikrospor (Jacquard a kol., 2009).

Stresové předošetření ovlivňuje také regeneraci rostlin.

Stresové působení se tedy používá ke spuštění procesu androgeneze, a to buď samostatně nebo v kombinaci více stresových faktorů zároveň (Smýkal, 2000, Datta, 2005, Maraschin a kol., 2005, Shariatpanahi a kol., 2006, Jacquard a kol., 2009).

Mezi stresové spouštěče mikrosporové embryogeneze řadíme:

- tepelný šok (Smýkal, 2000, Shariatpanahi a kol. 2006, Zur a kol., 2009),
- působení chladu (chládový šok) (Zur a kol., 2008, 2009),
- metabolické hladovění (např. živin, kyslíku, sacharidu, uhlíku) (Smýkal, 2000, Datta, 2005, Shariatpanahi a kol. 2006, Zur a kol., 2008, 2009),
- chemický stres (Pasternak a kol., 2007, Jacquard a kol., 2009),
- použití mitotického jedu kolchicinu (Smýkal, 2000, Maraschin a kol., 2005, Shariatpanahi a kol. 2006, Bohanec, 2009),
- vysoké koncentrace pH či rostlinných hormonů (např. 2,4-D, 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina) (Pasternak a kol., 2007, Shariatpanahi a kol., 2006, Bohanec, 2009),
- osmotické výkyvy nebo hypertonický šok (Maraschin a kol., 2005, Shariatpanahi a kol., 2006, Jacquard a kol., 2009, Bohanec, 2009),
- snížený atmosferický tlak (Shariatpanahi a kol., 2006),
- působení těžkých kovů (např. lithia), ethanolu, kyseliny abscisové či síranu měďnatého (Shariatpanahi a kol., 2006),
- působení odstředivé síly (Shariatpanahi a kol., 2006),
- gama záření aj. (Shariatpanahi a kol., 2006).

Nejčastěji jsou využívány vysoké či nízké teploty, glycidové či dusíkové hladovění, vysoké osmotikum či použití kolchicinu (Zur a kol., 2008).

Jaký vliv bude stres na kulturu mít je určeno:

- druhem stresu (chlad, teplo, hladovění...) (Kruczkowska a kol., 2002, Zur a kol., 2008, Wrobel a kol., 2011),

- při jaké vývojové fázi (mikrospory) stres působí (Bohanec, 2009),
- při jaké intenzitě a jak dlouhé je stresové ovlivnění (Procházka a kol., 1998).

3.2.3.1 Teplotní předošetření

Veškeré stresové podmínky musí být optimalizovány pro každý rostlinný druh i genotyp zvlášť. Stresování určitým typem teploty vede u mnoha rostlinných druhů k zlepšení androgenní odpovědi (Datta, 2005). Například pro některé genotypy ječmene se typicky používá chladové předpůsobení při 4 °C, naproti tomu kultivary rýže si vyžadují chlad 8 °C (Smýkal, 2000, Kruczkowska a kol., 2002, Datta, 2005, Preťová a kol., 2006, Zur a kol., 2008, Wędzony, 2009). Pro chlad je například rozhodující doba, po kterou tento stresor působí. Chlad způsobuje fyzikálně chemické změny membrány. Postiženy bývají i struktury cytoskeletu. Největším postižením jsou zasaženy chloroplasty, následují mitochondrie a peroxizomy. Vliv chladu je spojován s tvorbou osmoticky aktivních látek, tvorbou stresových proteinů (cold – induced proteins) a nárůstem nenasycených mastných kyselin. Objevuje se i vyšší koncentrace kyseliny abscisové – ABA (Procházka a kol., 1998). Chladové předpůsobení není nutné vždy použít, ale obecně je prospěšné pro prašnickové kultury a pravděpodobně přispívá k regeneraci zelených rostlin. Pro zvyšování androgenní odpovědi může být využita kombinace chladového předpůsobení a tepelného šoku, přičemž tato kombinace nemá negativní vliv na regeneraci zelených rostlin (Tenhola-Roininen a kol., 2005).

Předošetření teplotním stresem se buď používá samostatně, nebo se doplňuje kombinacemi s jinými stresovými podmínkami. Předošetření prašnickových kultur jarních kultivarů *tritikale* odrůd Miezska a Wanad teplotou 5 °C použitou po 3 týdny vedlo ke zvýšení endogenní hladiny ABA, jež byla označena za signální molekulu v re-programování gametofytického vývoje, a bylo odhaleno i zvýšení jejich metabolické aktivity (Zur a kol., 2008, 2009). Preťová a kol. (2006) uvádí pro ječmen předošetření 3 – 4 dny chladového šoku při 4 °C nebo 3 – 4 dny použití manitolu při pokojové teplotě. V další studii byla androgeneze v prašnicích ječmene kultivaru Igri a kultivaru Cork úspěšně vyvolána prostřednictvím chladového a osmotického stresu k navození mikrospоровé embryogeneze (Jacquard a kol., 2009). Dále bylo porovnáno působení chladu 4 °C (28 dní) s metabolickým hladověním po dobu 4 dnů v roztoku 0,3mol/l manitolu pro tři odrůdy ječmene (vysokoresponzivní kultivar Igri a méně responzivní kultivary Horus a Mobek).

Chladový šok zvýšil tvorbu embryí/kalusů u všech použitých odrůd, ale regenerace do zelených rostlin byla efektivnější po použití manitolu.

Stresové předošetření nejen indukuje androgenezi, ale má i vliv na viabilitu kultivovaných mikrospor. Manitolové předošetření ve srovnání s chladovým působením je více škodlivé pro životaschopnost a vývoj pylu během předošetření. Současné použití obou stresů zároveň se jevílo jako neúčinné (Kruczkowska a kol., 2002). V experimentech Zur a kol. (2008, 2009) chladové předošetření zvýšilo viabilitu mikrospor *tritikale* (kultivary Miezska a Wanad) v porovnání s mikrosporami, které nebyly předošetřeny. Bez chladového ošetření mikrospory nezahájily androgenetickou indukci. Vysoká teplota měla opačný negativní vliv na životaschopnost mikrospor i jejich androgenní odpověď.

Androgeneze není přímým efektem působení nízké teploty, samostatně je nízká teplota nedostačující k vyvolání tohoto procesu, avšak nízká teplota se dá pokládat za stresový faktor zajišťující cytologické změny mikrospor (Zur a kol., 2008).

3.2.3.2 Předošetření kolchicinem

Kolchicin použitý jako předošetření stimuloval embryogenezi a produkci embryí, u nichž docházelo ke spontánnímu zdvojování chromozomové sady a následnému zisku dihaploidních rostlin (Maraschin a kol., 2005, Shariatpanahi a kol., 2006, Bohanec, 2009). Kolchicin, jako mitotický jed, blokuje tvorbu mikrotubulů během buněčného dělení. Selhání funkce mitotického vřetenka vede k spontánní endoduplikaci. Vliv kolchicinu na reakci mikrospor pravděpodobně závisí na vývojovém stádiu mikrospory. Kolchicin způsobuje zvýšenou koncentraci volných tubulinových struktur, a tím zamezuje tvorbě nových tubulů, následkem je přepnutí gametofytického vývoje pylu na sporofytický (Shariatpanahi a kol., 2006).

3.2.4 Kultivační média a jejich složky

Živná půda skýtá nejen výživové hodnoty, ale také se podílí na regulaci vývoje mikrospory do embrya. Správné složení média a zachování vyváženého pH je nezbytné pro úspěšnou indukci androgeneze. Nejčastěji používaná jsou dvě základní média, N6 médium (Chu, 1981) a MS médium (Murashige a Skoog, 1962) vhodná pro indukci androgeneze obilnin i jiných rostlinných druhů, buď v základním nebo obohaceném složení. Ve složení média hraje významnou roli dusík, kdy zvyšování glutaminu a snižování obsahu dusičnanu amonného vede u mnoha druhů obilovin ke zrychlení embryonálního vývoje. Sacharidy

v médiu obsažené slouží jako zdroj energie pro vyvíjející se embrya, ale mají i osmotickou funkci. Náhrada sacharózy v médiu maltózou zvyšuje indukci androgeneze, avšak koncentrace sacharidů musí být uzpůsobena dané plodině. Regenerace rostlin z embryí má také přísné požadavky na složení média, kdy regenerační médium již obsahuje snížené množství sacharidů a zvýšený obsah cytokininů a auxinů (Datta, 2005).

Důležitým faktorem složení je obsah dusíkatých složek, mikroprvků, vitamínů, organických sloučenin, přídavky výživových látek jako např. kokosového mléka nebo kvasničného extraktu. Nepostradatelnými jsou i ionty některých kovů např. železa, jenž nemusí být zahrnuto ve složení základního média, ale jeho přítomnost v médiu regeneračním je nezbytná (Ohnoutková, 2000).

Média využívaná pro obilniny jak indukční, tak regenerační by ve svém složení měly obsahovat růstové hormony, a to auxiny a cytokininy, kdy rozhodující je využitá koncentrace. Pro obilniny a ječmen se obecně využívá 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina, Kruczkowska a kol., 2002) v koncentraci 0,2 - 2 mg/l, která však ve vyšších koncentracích může působit i jako doplňkový stresový faktor k vyvolání procesu androgeneze. Samotná přítomnost 2,4-D nestačí k indukci androgeneze, ale musí být použita v kombinaci s jinými stresory (Shariatpanahi a kol., 2006). Regenerační médium typu 190 – 2 (Zhuang a Xu, 1983) obsahuje kinetin (0,25-0,5 mg/l) či NAA (0,5 mg/l) (Zur a kol. 2008, 2009). Z dalších růstových regulátorů je využívána kyselina indolyl-3-octová (IAA – 1 mg/l) či 6-benzylaminopurin (BAP – 1 mg/l, Kruczkowska a kol., 2002).

Nejčastěji se používá médium ztužené agarózou nebo Phytagelem, dále se mohou využívat i nově zavedené plouvoucí kultury, kdy prašníky splývají na hladině tekutého média.

3.2.5 Další podmínky kultivace ovlivňující androgenetickou indukci

Kultivace prašníků probíhá ve tmě v rozmezí teplot 25 - 32 °C, kdy po 4 - 6 týdnech se vyvinutá pylová embrya či kalusy přenesou na regenerační médium, na němž se již kultivují za světla. Teplota kultivace je závislá na druhu rostliny, na genotypu dárcovského organismu a na původních podmínkách, v nichž se donor pěstoval (Ohnoutková, 2000). Viabilita mikrospor a jejich schopnost přizpůsobit se na podmínky *in vitro* je jedním z důležitých předpokladů pro indukci mikrosporové embryogeneze. Podstatným faktorem, který udržuje životaschopnost mikrospor je hustota mikrosporové suspenze. Neoptimální hustota *in vitro* kultury narušuje rovnováhu mezi metabolity vylučovanými buňkami do

životního prostředí a živinami vstřebávanými z média. Minimální hustota je nezbytná pro další vývoj mikrospor a závisí na genotypu a metodě kultivace (Zur a kol., 2009).

3.2.6 Albinismus

Zajímavým a dosud málo probádaným rysem rostlin odvozených z kultivovaných mikrospor a prašníků je albinismus. Albikátní rostliny obsahují porušené formy plastidů nebo obsahují nezralé chloroplasty. Tyto rostliny mají nedostatečný či poškozený genetický kód v oblasti *rbcL* genu a důležitou roli hraje při jejich vzniku genotyp dárcovské rostliny (Datta, 2005). Na růstu a vývoji regenerovaných rostlin se svou aktivitou podílí i geny, jež řídí produkci některých enzymů potřebných pro metabolické pochody a morfogenezi. Patří sem zejména peroxidázy, které jsou spojovány s mnoha fyziologickými procesy, včetně morfogeneze. To bylo potvrzeno v mnoha experimentech, kdy zelené rostliny regenerantů vykazovaly vyšší aktivitu peroxidáz než „albíni“ (Datta, 2005). Za zmínku stojí i glutathion-S-transferázy, jejichž genová exprese je spojena s *in vitro* morfogenezí (Jacquard a kol., 2009). Avšak indukce a regenerace albínů a zelených rostlin z prašnickových kultur jsou regulovány odlišnými geny (Tenhola-Roininen a kol., 2005). Regenerace zelených a albikátních rostlin může být závislá i na přítomnosti síranu měďnatého v médiu, jehož přítomnost může podporovat regeneraci všech nebo jen zelených rostlin (Jacquard a kol., 2009). Podrobnější objasnění tohoto jevu však musí být ještě provedeno.

3.3 Oxidativní stres

Vzhledem k tomu, že rostliny mají omezenou možnost úniku před stresem, potřebují flexibilní způsob adaptace na měnící se podmínky životního prostředí. Společným rysem pro různé stresové faktory bývá právě vzrůst produkce reaktivních kyslíkových radikálů v rostlinném pletivu (Arora a kol., 2002). Působící stresové faktory mohou tedy u rostlin vyvolat oxidativní stres, jenž je charakteristický vysokou produkcí obrovského množství aktivních kyslíkových forem, kdy dochází k narušení rovnovážného stavu mezi tvorbou a odbouráváním kyslíkových radikálů (Piterková a kol., 2005).

Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty, jež jsou schopny samostatné existence a vlastní ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Jsou to struktury vysoce reaktivní, které jsou schopny reagovat s ostatními volnými radikály, ale i s inaktivními molekulami za vzniku dalších volných radikálů, kdy tento děj

může pokračovat prostřednictvím řetězové reakce (Racek a Holeček, 1999). Volné radikály jsou molekuly nestabilní a interagují často a rychle s jinými látkami tak, že odevzdávají látce svůj nepárový elektron nebo naopak látce elektron odebírají, aby doplnily svůj elektronový pár a látku přitom oxidují.

Za nejdůležitější volné radikály jsou považovány volné radikály kyslíku. Prostřednictvím dalších přeměn z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, ovšem již bez obsahu nepárového elektronu (např. peroxid vodíku). Tyto látky se pak vzájemně označují jako reaktivní formy kyslíku (Racek a Holeček, 1999). Volné radikály a další aktivní formy kyslíkových derivátů se stávají nevyhnutelnými produkty biologických redoxních reakcí (Arora a kol., 2002).

Zvýšená produkce toxických derivátů kyslíku je považována za univerzální nebo běžný rys stresových podmínek (Arora a kol., 2002). Role ROS je závislá na jejich koncentraci, době a lokalizaci jejich působení (Fehér a kol., 2008). Reaktivní formy kyslíku mohou v buněčných reakcích inaktivovat enzymy a poškozovat důležité buněčné komponenty. ROS slouží jako signální molekuly při expresi genů, ale jsou to i škodlivé meziprodukty aerobního metabolismu, jež se podílejí na oxidativním poškození (Piterková a kol., 2005), mohou spouštět buněčné dělení (Fehér a kol., 2008) nebo vést až zániku rostlinné buňky (Piterková a kol., 2005).

Za normálních aerobních podmínek je produkce ROS vyvažována pomocí buněčných antioxidačních mechanismů, které předcházejí poškození buněk (Taiz a Zeiger, 2010). V optimálních růstových podmínkách je tedy jejich tvorba přísně kontrolována systémem antioxidantů, které brání jejich úniku do prostředí buňky. Antioxidační obranný systém rostlin obsahuje různé antioxidační enzymy a molekuly. Za nestresových podmínek antioxidační obranný systém poskytuje dostatečnou ochranu proti aktivním kyslíkovým formám a volným radikálům (Arora a kol., 2002). V podmínkách stresu je však zpravidla produkce ROS vyšší než kapacita antioxidantů a dochází k poškození buněk, které se označuje jako oxidativní stres (Arora a kol., 2002), kdy je tvorba ROS zvýšená a přesahuje detoxikační kapacitu buněk, což vede k jejich oxidativnímu poškození (Pasternak a kol., 2007). Oxidační stres tedy nastává v případě, že se vyrábí více kyslíkově aktivních forem než je potřeba pro běžný metabolismus (Arora a kol., 2002). Stresové situace vyprodukují zvýšenou produkci toxických derivátů kyslíku a jako odpověď na to vzrůstá i kapacita antioxidačního obranného systému, ale ve většině případů je tato odpověď jen mírná (Arora a kol., 2002).

3.3.1.1 Výskyt a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů

Existuje množství zdrojů kyslíkových radikálů v rostlinných buňkách, kdy některé z nich jako například fotosyntéza či respirace jsou součástí běžného rostlinného metabolismu, ale jiné probíhají za biochemických pochodů pouze za stresových podmínek (Piterková a kol., 2005). Hlavním zdrojem aktivního kyslíku je fotosyntetický systém kyslíkové redukce dýchacího elektronového transportu, při němž se v rostlinných pletivech generuje zejména singletový kyslík a superoxid (Piterková a kol., 2005, Taiz a Zeiger, 2010). Tvorba aktivních forem kyslíku se zdá být nevyhnutelným důsledkem fungování elektronového transportního řetězce v kyslíkové atmosféře (Arora a kol., 2002)

Mezi nejběžnější ROS formy v rostlinných buňkách tedy řadíme (Taiz a Zeiger, 2010):

- superoxid $O_2^{\bullet-}$,
- singletový kyslík 1O_2 ,
- peroxid vodíku H_2O_2 ,
- hydroxylový radikál OH^{\bullet} .

Peroxid vodíku a superoxidový radikál nejsou samy o sobě tak škodlivé, ale mohou vytvářet mnohem více toxické hydroxylové radikály OH^{\bullet} , které mohou iniciovat peroxidaci lipidů a také napadat DNA, proteiny a malé molekuly (Arora a kol., 2002).

S tvorbou ROS souvisí i řada látek používaných jako herbicidy. Herbicidy typu bipyridinium tvoří kyslíkové radikály přímo na světle. Sloučeniny jako je paraquat, také známý jako methyl viologen, jsou závislé na světle a způsobují oxidativní poškození v rostlinách. Di-kationtová povaha paraquatu umožňuje jeho redukci na radikálový kation. Fotosystém I zprostředkuje redukci paraquatového di-kationtu. Výsledkem je mono-kationtový radikál, který pak reaguje s molekulárním kyslíkem za tvorby O^{2-} a následnou přeměnou na jiné toxické druhy, což může být H_2O_2 a OH^{\bullet} (Arora a kol., 2002).

3.3.1.2 Způsob tvorby

Většina buněčných součástí, včetně apoplastu a plazmatické membrány, má předpoklad k tomu, aby se stala zdrojem aktivních forem kyslíku (označovaných AOS nebo ROS). Na zvýšené enzymatické tvorbě reaktivních kyslíkových forem se účastní zejména NADPH-oxidáza, aminoxidáza a peroxidáza vázána na buněčnou stěnu.

Enzymová produkce kyslíkových forem je tedy vázána na enzymatické reakce, kterými se zejména produkuje superoxidový radikál (Piterková a kol., 2005).

Superoxidový radikál

Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku a je to nejčastěji se vyskytující volný radikál v organismech. Tvoří se při přenosu elektronů v dýchacím řetězci a při fotosyntéze v chloroplastech. Některé rostlinné buňky ho tvoří prostřednictvím NADPH-oxidázy. NADPH-oxidáza katalyzuje vznik superoxidu jednoelektronovou redukcí kyslíku (Racek a Holeček, 1999).

Superoxidové radikály jsou tedy odbourávány superoxidodismutázou v reakci produkující peroxid vodíku, kdy peroxid vodíku je přeměněn na kyslík a vodu katalázou nebo využit při oxidaci askorbátu. V chloroplastech vytvořený superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) je výsledkem fotoredukce di-kyslíku. Redoxní stav ferredoxinového poolu v tylakoidech určuje regulovaná aktivace Calvin-Bensonova cyklu a kontrola míry proudění elektronů. Ferredoxin a elektronové přenašeče na redukované straně fotosystému I mají dostatečně negativní elektrochemické potenciály k „zapůjčení“ elektronu pro kyslík, což má za následek vytvoření superoxidového radikálu (Arora a kol., 2002).

Superoxid je mírně reaktivní, neproniká skrz biologické membrány a působí jako oxidační i redukční činidlo. Oxiduje askorbát, NADPH, některé aminokyseliny (histidin, methionin, tryptofan) a komplexy přechodných kovů, čímž má vliv na aktivitu metaloenzymů (Piterková a kol., 2005).

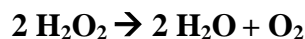
Superoxid není příliš reaktivní a tedy ani příliš škodlivý, toxicita superoxidu spočívá v jeho přeměně na reaktivnější kyslíkové formy, jako je peroxid vodíku či hydroxylový radikál (Racek a Holeček, 1999).

Singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál

Singletový kyslík může svou excitační energii přenést buď na jiné molekuly, nebo reagovat za tvorby hydroperoxidů. Druhým způsobem je aktivace kyslíku jednoelektronovou redukcí, kdy se vytváří superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku H_2O_2 , hydroxylový radikál OH^{\cdot} a voda (Piterková a kol., 2005).

Peroxid vodíku je poměrně stabilní molekula, která je však schopna procházet buněčnými membránami. Peroxid vodíku může být (Piterková a kol., 2005):

1. rozkládán na vodu a kyslík v reakci katalyzované katalázou:



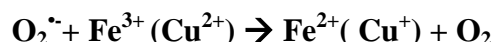
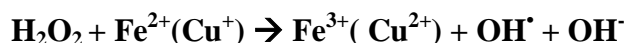
2. využít jako substrát pro peroxidázy

3. eliminován skrze askorbátperoxidázu, jež působí spolu s dehydroaskorbátreduktázou a glutathionreduktázou, kdy se jedná o redukci molekulárního kyslíku za produkce hydroxylového radikálu, který se může tvořit přímou Haber-Weissovou reakcí:



Enzymatická redukce monodehydroaskorbátu probíhá v plastidech. Monodehydroaskorbát samovolně dismutuje na dehydroaskorbát, může reagovat s glutathionem (GSH) za tvorby askorbátu a oxidovaného glutathionu (GSSG) v reakci katalyzované dehydroaskorbátreduktázou (Piterková a kol., 2005).

Nebo prostřednictvím Fentonovy reakce (Piterková a kol., 2005):



Hydroxylový radikál je velmi silný oxidant, který aktivuje řetězové radikálové reakce s množstvím organických molekul, což podněcuje lipidovou peroxidaci, inhibici enzymů a poškození nukleových kyselin (Piterková a kol., 2005). Hydroxylový radikál může tedy iniciovat proces lipoperoxidace (Racek a Holeček, 1999).

3.3.1.3 *Místa výskytu*

ROS akumulace při rostlinné odpovědi je pozorována v jádrech, chloroplastech, mitochondriích, peroxizómech i plazmatické membráně (Van Breusegem a kol., 2008), kde se ROS tvoří při fotosyntéze, respiraci, fotorespiraci a působením NADH-oxidázy.

3.3.1.4 *Význam oxidačního stresu*

ROS se nejen zúčastňují signalizačních procesů rostlin, ale také regulují jejich růst i vývoj a mohou zahajovat obranné reakce (Foyer a Noctor, 2005). Například mohou mít i přímý antimikrobiální účinek, kdy posilují proteiny buněčné stěny a H_2O_2 může zvýšit jejich nerozpustnost, a tím i odolnost vůči stresovým faktorům (Procházka a kol., 1998). Hrají také roli v hypersenzitivní reakci při napadení patogenem. H_2O_2 ve spolupráci s kyselinou salicylovou indukuje syntézu některých stresových proteinů. ROS jsou také

zapojeny do procesů závislých na hormonech. Propojení ROS a hormonální signalizace je velmi složitým celkem (Pasternak a kol., 2007). Kyslíkové formy v souvislosti s auxinem hrají úlohu při aktivaci buněčného cyklu, díky nimž byl urychlen vstup do G1 fáze (Pasternak a kol., 2007, Fehér a kol., 2008). Podobné účinky byly publikovány i pro askorbát a askorbát oxidázu (Foyer a Noctor, 2005). ROS hrají i významnou roli při aktivaci signálních dráh vedoucích k programované buněčné smrti (Van Breusegem a kol., 2008).

Negativní efekt ROS spočívá v jejich reakci s nenasycenými mastnými kyselinami obsaženými v membránách, což vede k peroxidaci membránových lipidů. Peroxidační zatížení plazmatické membrány nebo membrány intracelulárních organel způsobuje únik buněčného obsahu a následnou buněčnou smrt. Intracelulární narušení membrán má vliv na respirační aktivitu mitochondrie a může vést ke ztrátě chloroplastové schopnosti vázat CO₂. Reaktivní kyslíkové radikály oxidují i proteiny, inaktivují enzymy a nevratně poškozují DNA a RNA. Všechny reakce vedou k buněčné smrti rostlinné buňky. Zvýšená koncentrace reaktivních kyslíkových forem je tedy podstatným ukazatelem pro vznik hypersenzitivní reakce a následovanou programovanou buněčnou smrt (Piterková a kol., 2005).

3.4 Antioxidační systém rostlin

Produkce reaktivních forem kyslíku během oxidativního stresu je základním projevem obranných reakcí v organismu rostliny. ROS zahajují expresi obranných genů a zvýšení aktivity antioxidačních enzymů, a jak již bylo zmíněno dříve jsou součástí signálních systémů a také plní ústřední úlohu při smrti hostitelské buňky během hypersenzitivní odpovědi na infekci způsobenou patogeny.

Ochranu před oxidačním stresem zajišťuje pro rostlinný organismus řada antioxidačních obranných systémů, které se vyskytují v různých strukturách rostlinné buňky (Arora a kol., 2002, Piterková a kol., 2005).

Účinná destrukce kyslíkových forem vyžaduje synchronní a regulované spolupůsobení všech antioxidačních systémů. Antioxidační kapacita je vázána na působení stresových faktorů, stejně jako na druhu, stádiu vývoje a fyziologickém věku rostliny (Piterková a kol., 2005).

Antioxidační obranné systémy se dělí na enzymové a neenzymové. K účinným neenzymovým antioxidačním se řadí askorbát, β -karoten, redukovaný glutathion a

α -tokoferol. Do specializovaných enzymů patří superoxid-dismutáza, peroxidáza, kataláza a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Piterková a kol., 2005, Březinová Belcredi a kol., 2007, Taiz a Zeiger, 2010).

Mezi enzymové antioxidanty rostlin lze zařadit tyto enzymy:

- superoxid-dismutáza (SOD),
- kataláza (CAT),
- peroxidázy (PEX),
- enzymy askorbát-glutathionového cyklu: askorbátperoxidáza, monodehydroaskorbátreduktáza, dehydroaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza, glutathionperoxidáza, glutathion S-transferázy.

Neenzymové antioxidanty zahrnují:

- askorbát,
- glutathion,
- α -tokoferol,
- β -karotenoidy,
- thioredoxinové systémy.

Neenzymové antioxidanty jako askorbát a glutathion byly při oxidativním stresu prokázány zejména v chloroplastech. Pro katabolismus reaktivních forem je nezbytné udržení poměru redukovaných/oxidovaných forem askorbátu a glutathionu, což zajišťují enzymy jako glutathionreduktáza, monodehydroaskorbátreduktáza a dehydroaskorbátreduktáza s využitím redukčních vlastností NADPH (Piterková a kol., 2005).

3.4.1 Superoxid-dismutáza

Významným antioxidačním enzymem rostlin je *superoxid-dismutáza*. Superoxid-dismutáza představuje rodinu metalo-enzymů a je řazena do skupiny oxidoreduktáz se svým systematickým názvem superoxid/superoxid oxidoreduktáza (Březinová Belcredi a kol., 2007). Katalyzuje přeměnu superoxidu na molekulární kyslík a H_2O_2 (Piterková a kol., 2005, Taiz a Zeiger, 2010). SOD je tedy obecným názvem pro soubor enzymů katalyzujících reakci přeměny superoxidu na peroxid vodíku (Procházka a kol., 1998). Odstraňuje superoxid, a tím snižuje riziko tvorby hydroxylových radikálů ze superoxidu přes kovem katalyzované reakce typu Haber-Weissovy reakce (Arora a kol.,

2002, Piterková a kol., 2005). Superoxiddismutáza se nachází v aerobních a fakultativně aerobních organismech a ve všech strukturách buňky citlivých na stres (Březinová Belcredi a kol., 2007).

V současnosti byly identifikovány tři izoformy SOD, které se odlišují díky kovům tvořícím jejich kofaktory (Taiz a Zeiger, 2010).

Arora a kol. (2002) uvádí, že tyto 3 izoenzymy SOD byly detekovány v různých rostlinných druzích a jedná se o Mn-SOD, Cu/Zn-SOD a Fe-SOD (Procházka a kol., 1998, Piterková a kol., 2005). V každé formě enzymu tento kovový iont během proteinové činnosti akceptuje elektrony ze superoxidových radikálů a pak je daruje pro produkci O_2 a H_2O_2 (Taiz a Zeiger, 2010). Byl však odhalen i nový izoenzym SOD obsažen ve *Streptomyces*, který ve svém aktivním místě obsahuje atom niklu (Piterková a kol., 2005).

Výskyt těchto forem se váže na různá místa v buňce. Mn-SOD se nalézá především v mitochondriích a peroxizómech. Nicméně objevily se i údaje o jejím výskytu v rozpustné cytozolové frakci (Arora a kol., 2002). Cu/Zn-SOD je lokalizována v cytoplasmě, chloroplastech a mitochondriích. Fe-SOD převážně objevující se v chloroplastech, se potvrzuje i v cytozolu, mitochondriích a peroxizómech (Racek a Holeček, 1999, Arora a kol., 2002, Březinová Belcredi a kol., 2007, Taiz a Zeiger, 2010).

Izoenzymy SOD lze klasifikovat na základě citlivosti k peroxidu vodíku a KCN. Cu/Zn SOD je peroxidem vodíku a KCN inaktivována, Mn-SOD je rezistentní k oběma inhibitorům a Fe-SOD podléhá inaktivaci způsobené peroxidem vodíku (Piterková a kol., 2005).

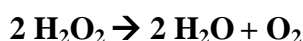
V experimentu Gucciardo a kol. (2007) byly pomocí cDNA knihoven objeveny tři germin-bílkoviny (PsGER1, PsGER2a a PsGER2b, izolované z rostlin hrachu, u nichž byla potvrzena superoxiddismutázová aktivita. Superoxiddismutázová aktivita PsGER1 byla odolná vůči vysokým teplotám, denaturaci detergenty i denaturaci pomocí vysoké koncentrace peroxidu vodíku. Koncentrace peroxidu vodíku do 5 mmol/l neměla žádný vliv na aktivitu SOD-PsGER1, což naznačuje, že se pravděpodobně jedná o Mn-SOD. PsGER1 se ale liší od mitochondriální Mn-SOD, což naznačuje nezávislý evoluční původ těchto dvou enzymů.

3.4.2 Kataláza

Kataláza (CAT) je hemový protein tetramérní struktury katalyzující detoxifikaci peroxidu vodíku (Piterková a kol., 2005). Tento protein o molekulové hmotnosti 240 kDa dále obsahuje 4 molekuly NADPH (Racek a Holeček, 1999). Existují různé typy katalázy. Více preferovaná forma, jež se vyskytuje v peroxizómech, oproti tomu méně častá forma se váže v cytoplazmě (Taiz a Zeiger, 2010). Jiná studie uvádí tři izoformy tohoto enzymu označované základní nomenklaturou jako CAT1, CAT2 a CAT3. Enzymy I. skupiny se vyskytují v listech a odstraňují peroxid vodíku v průběhu fotorespirace. Enzymy II. skupiny jsou lokalizovány v cévních svazcích a enzymy III. skupiny, jež odbourávají peroxid vodíku z glyoxyzómů jsou obsaženy v semenech a mladých semenáčcích (Piterková a kol., 2005).

Kataláza ke své aktivitě nevyžaduje žádné redukční činidlo, avšak afinita tohoto enzymu k peroxidu vodíku je mnohem menší než u peroxidáz a pohybuje se v rozsahu mmol. Za odbourání zvýšeného množství H_2O_2 , obzvláště pak během stresových podmínek, je nejspíše zodpovědná právě kataláza (Zur a kol., 2008).

Peroxisómy obsahují značné množství katalázy, ale vlastnosti katalázy naznačují, že enzym je neefektivní při odstraňování nízkých koncentrací H_2O_2 (Arora a kol., 2002). Kataláza štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík (Racek a Holeček, 1999):



3.4.3 Peroxidázy

V rostlinné a živočišné říši se vyskytuje více druhů peroxidáz. Peroxidázy mohou být nespecifické a oxidují více různorodých substrátů, jiné pro sebe potřebují specifický substrát (Racek a Holeček, 1999). Nově byly objeveny extracelulární peroxidázy a 2 typy peroxidázy III, které se mohou aktivně podílet na utváření H_2O_2 a také mohou vystupovat v událostech následné buněčné smrti v lokální i systémové reakci rostliny na patogena (Van Breusegem a kol., 2008).

Glutathionperoxidázy

Glutathionperoxidázy jsou enzymy, jež hrají roli zejména při blokaci peroxidace membránových lipidů. Katalyzují redukci peroxidu vodíku, organických peroxidů a peroxidů lipidů s využitím glutathionu jako redukčního činidla (Racek a Holeček, 1999, Piterková a kol., 2005). Glutathionperoxidázy mají zásadní funkci i při redoxní regulaci

transkripční aktivity a signálních drah jak v rostlinných, tak v živočišných organismech (Piterková a kol., 2005).

Askorbát oxidáza a její výskyt

Askorbát oxidázy byly identifikovány v apoplastu, kdy jejich činnost výrazně kontroluje redoxní stav askorbátového poolu, jenž může být udržován skrze plazmatickou membránu, kdy askorbátový redoxní stav apoplastu musí být mnohem více oxidovaný než cytozolický. Tento askorbátový pool udržuje správný růst rostlinného organismu a podílí se na aktivitě obranných mechanismů (Foyer a Noctor, 2005).

3.4.4 Enzymy askorbát–glutathionového cyklu

Tento cyklus je v rostlinách nazýván také jako Foyerův-Halliwellův-Asadův cyklus a odbourává peroxid vodíku z buněčných struktur, ve kterých vzniká činností oxidačního stresu a ve kterých není přítomen enzym kataláza. Cyklus využívá neenzymatických antioxidantů askorbátu a glutathionu a probíhá v chloroplastech, peroxizómech, cytozolu a mitochondriích (Piterková a kol., 2005).

Glutathionreduktáza

Glutathionreduktáza užívá k udržení hladiny redukovaného glutathionu NADPH. Redukovaný glutathion pak přijímá elektrony od volných radikálů jako je superoxid nebo peroxid vodíku (Taiz a Zeiger, 2010).

Askorbátperoxidázová aktivita a kyselina askorbová (L-askorbát)

L-askorbát se vyskytuje ve většině rostlinných buněk, hraje roli v některých fyziologických procesech jako je růst, diferenciacce či metabolismus rostlin. Redukuje mnohé volné radikály, a tím minimalizuje oxidativní poškození. Eliminuje superoxid, hydroxylové radikály, singletový kyslík a peroxid vodíku, který redukuje na vodu cestou askorbát-peroxidázové reakce (Piterková a kol., 2005). Ve vysokých koncentracích můžeme pozorovat výskyt askorbátu v chloroplastech, cytozolu, vakuole a apoplastickém prostoru listových buněk, kdy nejvyšší askorbátperoxidázová aktivita byla zachycena v chloroplastech a cytozolu. Nedávné studie potvrzují i výskyty v mitochondriích (Arora a kol., 2002). Syntéza askorbátu se soustřeďuje mezi cytozol a mitochondrie, zatímco degradace se zřejmě váže na apoplast (Foyer a Noctor, 2005). Askorbát se zdá být nejdůležitějším antioxidantem v rostlinách se zásadní funkcí při eliminaci peroxidu vodíku. Oxidace askorbátu se vyskytuje ve dvou postupných krocích, kdy se nejprve produkuje

monodehydroaskorbát, jenž se rozpadá za vzniku dehydroaskorbátu a askorbátu (Arora a kol., 2002). Askorbát hraje důležitou roli v detoxifikaci ROS vytvořených účinkem ozónu (Taiz a Zeiger, 2010).

Askorbát a glutathion, ve velkém množství obsažené v chloroplastech, nejspíše poskytují buňce největší antioxidační ochranu, při čemž kyselina askorbová může zreagovat se superoxidem a singletovým kyslíkem i bez přítomnosti enzymů (Procházka a kol., 1998).

3.4.5 Aktivita antioxidačních enzymů v průběhu androgeneze

V posledních letech je předmětem zájmu změna aktivity antioxidačních enzymů v důsledku působení stresu. S tímto problémem souvisí i endogenní obsah ABA či schopnost indukovat androgenezi. U jarních kultivarů *tritikale* se při stresovém předošetření prašníků (3 týdny chladového působení při 5 °C) zintenzivněla životaschopnost, což se projevilo zvýšenou hladinou endogenní ABA. Toto předošetření však způsobilo snížení aktivity peroxidázy (Zur a kol., 2009). Stabilní aktivita SOD a snížená aktivita PEX naznačovaly zapojení H₂O₂ do obranné reakce vůči stresu a do indukce androgenetické odpovědi. Při použití nízké teploty v kombinaci s metabolickým hladověním, aktivita antioxidačních enzymů nebyla změněna (Zur a kol., 2008, 2009).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Ječmen obecný (*Hordeum vulgare* L.), $2n = 14$

Zrna jarního ječmene byla odvozena od genotypů responzibilních dihaploidních linií.

Pro experiment byly vybrány tyto tři dihaploidní linie jarního ječmene:

DH Šp 122/60 – dihaploidní linie získaná v rámci šlechtitelského programu ze Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži, ZVÚ, s. r. o., pracovně byla označena jako genotyp M2, dále pak **DH GPUK 99/3** – zrna Golden promise, označena jako M8 a linie **DH GPUK 99/4** – M9.

GOLDEN PROMISE je starší odrůda jarního dvouřadého ječmene sladovnického typu, která byla vyšlechtěna v roce 1956 v Anglii. Pro svoji vysokou indukční a regenerační schopnost v *in vitro* podmínkách se nejčastěji používá k transformaci, a to jak pomocí mikroprojektilového přenosu DNA, tak i pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Náš experiment potvrdil využití této odrůdy také při androgenezi.

Pozn. V některých pokusech byly genotypy M8 a M9 zahrnuty společně jako jedna skupina, protože oba genotypy při předchozím pěstování poskytovaly podobné množství zrn, vzájemně se nelišily a to jak ve vzhledu donorových rostlin, tak ani v jejich androgenním potenciálu.

4.2 Pěstování donorových rostlin

Linie jarního ječmene Golden promise a DH 122/60 byly sázeny do květináčů naplněných směsí substrátu. Rostliny byly pěstovány asi 20 dnů ve fytotronu (osvětlení - dne 16 hodin, teplota 15 °C, noc - tma 8 hodin, teplota 12 °C a poté byly přesunuty do skleníku na dopěstování (osvětlení 5 – 7 hod. a 18 – 21 hod., teplota noc 12 °C, den 15 °C).

Během pěstování byly rostliny pravidelně přihnojovány NPK hnojivem daného složení (12,4 % celkového dusíku, 11,4 % celkového obsahu fosforu a 17,7 % draslíku).

4.3 Odběr rostlinného materiálu

Pro kultivaci byly využívány prašníky z klasů primárních odnoží. Klas se stéblem byl z donorových rostlin odebírán ve vhodném období vývoje mikrospor, kdy prašníky obsahovaly mikrospory ve středním až pozdním jednojaderném stádiu, což bylo ověřeno pomocí barvení acetokarmínem a pozorování světelným mikroskopem typu Olympus BX 50.

Za účelem orientačního srovnání enzymové aktivity mezi embryogenním a neembryogenním rostlinným pletivem byl pro analýzy použit i jiný typ rostlinného materiálu.

Pro analýzu izozymového složení (CAT, APX a SOD) neembryogenního pletiva byly použity listy jarního ječmene linií Golden promise a DH 122/60, jež byly ošetřeny metodou postřiku 10 $\mu\text{mol/l}$ roztokem paraquatu (methyl viologen, Sigma 856177, 40 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$) (15 ml vody + 6 μl paraquatu + kapka roztoku TWEEN 20, Sigma, P2287). Vzorky listového pletiva byly odebrány před paraquatovým ošetřením, 2 dny po něm a paralelně bylo neembryogenní listové pletivo odebráno z kontrolních rostlin bez ošetření (pouze postřik 15 ml vody s kapkou TWEEN 20, Sigma, P2287). Následná extrakce bílkovin, příprava vzorků pro elektroforézu a izozymové analýzy probíhaly podle stejného postupu, jak je popsáno u prašnickového materiálu.

4.4 Izolace prašníků

Izolace prašníků z klasů byla provedena pomocí preparačních jehel. Prašníky pro biochemické analýzy byly přeneseny do mikrozkušavek (cca 200 ks prašníků/vzorek tj. 3 – 4 klasy) a byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

4.5 Kultivace prašníků

Prašníky s chladovým předošetřením byly připraveny podle tohoto schématu práce:

1. Sběr rostlinného materiálu, působení chladu, sterilizace klasů, izolace prašníků.
2. Aplikace vyizolovaných prašníků na indukční médium vhodné pro androgenezi ječmene.
3. Pasážování kalusů na regenerační média vhodného složení.
4. Regenerace rostlin.

5. Přenos *ex vitro*.

6. Dopěstování rostlin v půdě.

4.5.1 Působení chladu

Přebytečné listové čepele byly ze stébla odstraněny. Na stéblu s latou byla ponechána jen poslední listová pochva a poslední kolénko stébla. Takto upravené stéblo bylo umístěno do nádoby s vodou a uchováno v chladu a temnu při teplotě 4 °C, po dobu 14 – ti dní.

4.6 Sterilizace prašníků respektive klasů

Stébla byla povrchově sterilizována pomocí 70% ethanolu, jenž se nechal působit 1 minutu. Takto ošetřená stébla byla ponořena do odměrných válců s 5% chloraminem (50 g NaClO do 1 l destilované vody) na dobu 20 minut. Poté byla stébla nejméně 3x omyta sterilní destilovanou vodou. Následně byly takto vysterilizované klasy vyjmuty ve sterilních podmínkách z listové pochvy pro izolaci jednotlivých prašníků.

Vyizolované prašníky pak byly umístěny na povrch kultivačního média (cca po 60 ks/P. miska) určeného k indukci androgenese, MN6 nebo MN6 + Dic. + TDZ (složení viz příloha PI).

Jako základní médium bylo použito médium MN6, které je na bázi N6 média (Chu, 1981). V experimentu bylo toto médium modifikováno zvýšením obsahu CuSO₄ na 25 mg/l a místo sacharózy byla použita maltóza v koncentraci 80 mg/l (Vagera a Ohnoutková, 1993). Pro indukci kalusu byly aplikovány dvě varianty tohoto média:

- a. přídavek růstových regulátorů: NAA (0,5 mg/l), 2,4-D (2 mg/l), KI (0,5 mg/l),
- b. přídavek Dicamby (0,5 mg/l) a TDZ (thidiazuronu) (0,5 mg/l, Li a Devaux, 2003).

4.6.1 Předošetření paraquatem

Vyizolované prašníky byly inkubovány 2 hod. v 1 ml 10 μmol/l roztoku paraquatu (methyl viologen, Sigma 856177). Tato mikrozkuška byla třepána po 2 hod. při 240 ot./min. Po působení paraquatu byly prašníky přeneseny na povrch média MN6 či MN6 + Dic. + TDZ. Pro každé předošetření a každou odrůdu bylo kultivováno cca 180 prašníků.

4.6.2 Kultivace prašníků

Kultivace prašníků probíhala v termostatu (Biological Thermostat BT 120) při teplotě 27 °C. Kultivace byla pravidelně kontrolována a v případě kontaminace byla prašниковá kultura pasážována na nové médium nebo nahrazena novými prašnýmiky či úplně odstraněna.

Po čtyřech až šesti týdnech se na médiu objevily kalusy, jež byly přeneseny na regenerační médium typu 190-2, námi označeném PR-1 (Pauk a kol., 1991, viz příloha PII), rozlitém v 250ml Erlenmeyerových baňkách.

Vzhled, velikost a barva kalusů byly pravidelně sledovány a dokumentovány (viz výsledky). K regeneraci byly využity kalusy dostatečné velikosti v rozmezí asi od 0,5 do 1 cm, které měly bílou nebo nažloutlou barvu. Kalusy nahnědlé až hnědočerné barvy byly pasážovány také pro zjištění jejich schopnosti regenerace.

4.6.3 Regenerace kalusů

Kalusy pro regeneraci byly kultivovány v kultivační místnosti při režimu osvětlení 8 - 24 hod./den a 24 - 8 hod./noc, teplota 20 – 23 °C). Asi po 4 týdnech byla pozorována regenerace celistvých rostlinek ječmene.

Regenerace rostlin z kalusů byla opět dokumentována, stejně tak byla porovnávána frekvence vzniku zelených a albinotických rostlin u jednotlivých odrůd. Dokumentace byla provedena digitálním fotoaparátem (Olympus, c – 4040ZOOM).

4.6.4 Dopěstování rostlin

Vyspělé zelené rostliny byly přesazeny z regeneračního média do „jiffipotů“ a dopěstovány do dospělých rostlin v kultivační místnosti (osvětlení 8 - 24 hod./den a 24 - 8 hod./noc, teplota 20 – 23 °C).

4.7 Aktivita antioxidačních enzymů

Jako rostlinný materiál byly použity prašnýmiky ječmene genotypů Golden promise a DH 122/60, které byly izolovány z klasů bez ošetření a po předošetření chladem a paraquatem.

4.7.1 Extrakce enzymů

Prašníky (cca 1 g čerstvé hmotnosti) byly rozetřeny pomocí vychlazeného třecího tloučku za použití tekutého dusíku. K prašnickovému homogenátu bylo přidáno 300 μ l 50mmol/l extrakčního fosfátového pufru pH 7,8 s přídavkem 2mmol/l askorbátu a 2mmol/l EDTA. Homogenát byl přepipetován do 1,5ml mikrozkušavky a následně centrifugován 15 min. při 13 000 g v chlazené centrifuze (BR4i Jouan). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a přepipetován do nové eppendorfky a následně uchován v mrazu při -20 °C pro další použití.

Supernatanty byly odsoleny a koncentrovány filtrováním na centrifugačních kolonách AMICON ULTRA ULTRACEL – 10K membrane (Millipore), přičemž byly odstraněny složky menší než 10 kDa. Po centrifugaci (15 min/14 000 g; 4 °C) byly získány odsolené a koncentrované vzorky, které byly zahuštěny pomocí přídavku glycerolu, kdy finální koncentrace glycerolu ve vzorku byla 10%.

4.7.2 Příprava vzorků pro elektroforézu

Vzorky byly označeny čísly 1 – 7.

Vzorek č. 1: 1/B M2 (25. 7. 2010),

Vzorek č. 2: 1/B M8 (26. 7. 2010),

Vzorek č. 3: 3/B M8 (27. 7. 2010),

Vzorek č. 4: 2/B M2 (3. 8. 2010),

Vzorek č. 5: 2/B M9 (3. 8. 2010),

Vzorek č. 6: 1/B M2 (28. 7. 2010),

Vzorek č. 7: 3/B M2 (25. 7. 2010).

Pozn. Vysvětlivky: 1, 2, 3 – označení použitého předpůsobení na prašníky: 1 – bez předpůsobení; 2 – chladové ošetření; 3 – ošetření paraquatem; M2, M8, M9 – označení genotypů, B – prašníky určené k biochemickým pokusům, (25. 7. 2010) – datum odběru rostlinného materiálu.

4.7.3 Stanovení obsahu bílkovin v extraktu

Obsah bílkovin v extraktu byl stanoven metodou podle Bradfordové (1976).

Jako standard pro zhotovení kalibrační křivky byl použit albumin (Bio Basic INC, AD0023), který byl rozpuštěn a zředěn v extrakčním pufru, jenž byl použit na extrakci bílkovin ze vzorků, na koncentrace 2, 4, 6, 8 a 10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$. Albumin (2 μl) byl přidán do reakční směsi složené z 198 μl vody a 800 μl Bradfordova činidla (Bradford reagent, Sigma B6916) a po 10 minutové inkubaci za pokojové teploty byla změřena absorbance reakčních směsí při vlnové délce 595 nm na spektrofotometru typu BIO RAD Smart SpecPlus Spektrophotometer.

Obsah bílkovin ve vzorcích byl změřen obdobným způsobem, přičemž standard byl nahrazen 2 μl extraktu. Finální obsah bílkovin byl odečten z kalibrační křivky.

4.7.4 Příprava elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek

Pro izozymovou analýzu byla použita nativní (vertikální) polyakrylamidová diskontinuální elektroforéza (aparatura Mini Protean Tetra Cell; Biorad). Elektroforéza byla prováděna za stálého chlazení.

Následně byly připraveny roztoky potřebné k přípravě 12% nativního polyakrylamidového gelu (tloušťka 1 mm), a to:

DĚLÍCÍ GEL 12%

Na 100 ml 12% resolving – dělicího gelu bylo smícháno:

30 ml 40% akrylamid/bisakrylamid v poměru 37,5 : 1 (Sigma, A7168)

25 ml 1,5mol/l TRIS HCl pH 8,8

43,5 ml dH₂O (v objemu vody byl započítán i objem SDS – dodecylsírany sodného, jenž byl nahrazen vodou)

50 μl TEMED

500 μl 10% APS

4% zaostřovací gel byl připraven ze směsi:

ZAOSTŘOVACÍ 4%

Na 25 ml 4% stack – zaostřovacího gelu bylo potřeba:

2,5 ml akrylamid/bisakrylamid

6,3 ml 0,5mol/l TRIS HCl pH 6,8

15,9 ml dH₂O (v objemu vody byl započítán i objem SDS – dodecylsírany sodného, jenž byl nahrazen vodou)

25 µl TEMED

125 µl 10% APS

Dále byl připraven roztok elektrodového pufru. 2 l pufru obsahovaly 6 g TRIS + 28 g glycinu.

4.7.4.1 Příprava gelů pro elektroforézu

Polymerace obou gelů byla zahájena přidávkem roztoku persíranu amonného do připravených směsí a monomer byl polymerizován při pokojové teplotě po dobu asi 30 min.

Do první jamky byl napipetován 1 µl bromfenolové modři ve směsi s glycerolem v poměru 3 : 1 pro monitorování průběhu elektroforézy. Elektroforéza probíhala při 10 mA asi 220 min. při teplotě 4 °C.

4.7.4.2 Analýza izozymů superoxididismutázy

Byly připraveny 2 roztoky pro barvení gelů.

Roztok A: 60 ml roztoku NBT (nitrobluetetrazolium chlorid)

Roztok B: celkový objem 60 ml, směs: fosfátového pufru pH 7,8 + 0,06mmol/l riboflavin (1,36 mg) + 5mmol/l EDTA (112 mg) + TEMED (195 µl), riboflavin a TEMED byl přidán jako poslední přísada roztoku.

Pro analýzu izozymů SOD bylo na gel nanášeno 35 µg bílkovin/vzorek. Izozymy SOD se rozlišují na základě své senzitivity k peroxidu vodíku, proto byly připraveny 2 gely, které byly nejprve inkubovány 15 min. v Na-fosfátovém pufru (pH 7,8) s nebo bez přidavku 30% H₂O₂ (50 µl/100 ml).

Gely po 15-ti minutové inhibici byly inkubovány v **roztoku A** po dobu 20 min., ve tmě. Následně byly přesunuty na inkubaci do **roztoku B** na 15 min., opět ve tmě při pokojové teplotě. Po 15 min. byly gely osvětleny studeným světlem až do objevení světlých proužků na tmavém pozadí. Výsledky byly zdokumentovány pomocí skenování na denzitometru ImageScanner III (GE Healthcare).

4.7.4.3 Analýza izozymů peroxidáz a askorbátperoxidáz

Podle předchozího postupu byly připraveny gely pro elektroforézu. Pro vyhodnocení peroxidázy byly objemy vzorků přepočítány na 25 µg bílkovin.

Barvení gelů pro peroxidázy:

Po elektroforéze byl gel inkubován v destilované vodě po dobu 10 min. Poté byl přenesen do **roztoku** (celkový objem 30 ml: směs Na-fosfátový pufr pH 7,0 + 0,05% 4-Cl-1-naftol (3 mg rozpustit ve 2 ml studeného methanolu) + 20 µl 30% H₂O₂). V tomto roztoku byl gel ponechán až do vybarvení. Poté byl gel opláchnut v destilované vodě, zafixován pomocí 5% kyseliny octové a oskenován.

Barvení gelů pro askorbátperoxidázy:

Pro vyhodnocení askorbátperoxidázy byly objemy vzorků přepočítány na 40 µg bílkovin. Gel pro askorbátperoxidázu byl inkubován ve 4 různých roztocích.

Nejprve byla provedena inkubace (2 x 10 min.) v **roztoku A**, který byl tvořen směsí 2mmol/l askorbátu a 50mmol/l Na-fosfátového pufru pH 7,0, celkový objem 60 ml. Následně byl gel přenesen do **roztoku B** na dobu 20 min. Celkový objem roztoku 30 ml: 50mmol/l Na-fosfátového pufru (pH 7,0) s přídavkem 4mmol/l askorbátu (21 mg/30 ml) + 2mmol/l H₂O₂ (6 µl/30 ml). Poté byl gel přemýván pomocí 50mmol/l Na-fosfátového pufru (pH 7,0) po dobu 1 minuty (**roztok C**). Nakonec byl gel vložen do **roztoku D** s obsahem 30 ml Na-fosfátového pufru (pH 7,0), 2mmol/l NBT (48,81 mg/30 ml) a 28mmol/l sloučeninou TEMED (132 µl/30 ml). V tomto roztoku byl gel do doby než došlo k vybarvení proužků. Poté byl gel zdokumentován.

4.7.4.4 Analýza izozymů katalázy

Pro vyhodnocení katalázy byly objemy vzorků přepočítány na 60 µg bílkovin.

Barvení gelů pro katalázu:

Po proběhnutí elektroforézy byl gel postupně promýván. Nejprve 3krát 5 minut v **destilované vodě**. Následně 10 minut v **roztoku 0,006% H₂O₂** (10 µl/50 ml) a nakonec v **1% roztoku ferrikyanidu/1% ferrichlorid**. Po objevení negativních bandů byl gel promyt v **destilované vodě**. Výsledný efekt katalázy na gelu byl naskenován.

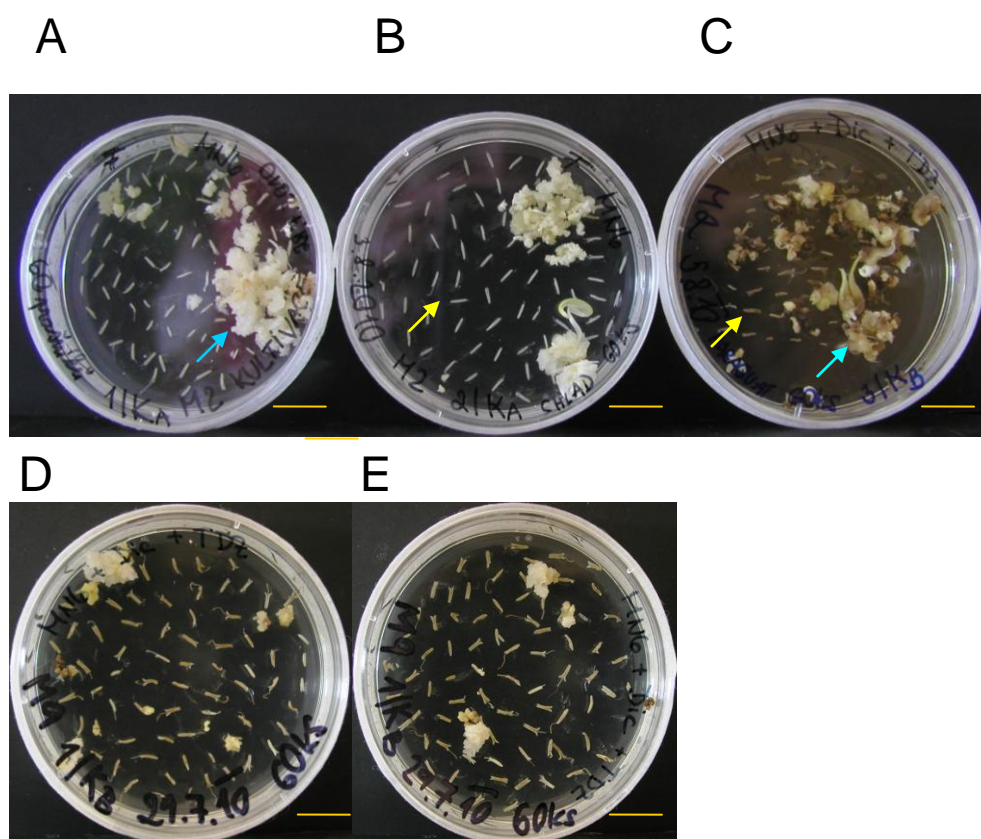
Mikroskopická pozorování

Mikroskopická pozorování byla provedena na roztlakových preparátech prašníků ječmene u použitých genotypů Golden promise a dihaploidní linie 122/60. Prašníky byly umístěny na podložní sklíčko a roztlačeny v kapce barvicího roztoku acetokarmínu za účelem uvolnění mikrospor obsažených v prašníku do barvicího roztoku. Roztlakový preparát byl překryt krycím sklíčkem, přebytečný barvicí roztok byl odstraněn pomocí filtračního papíru a preparát byl pozorován pomocí příslušného mikroskopu. Mikroskopické pozorování probíhalo ihned po přípravě roztlakových preparátů.

5 VÝSLEDKY

5.1 *In vitro* kultivace prašníků

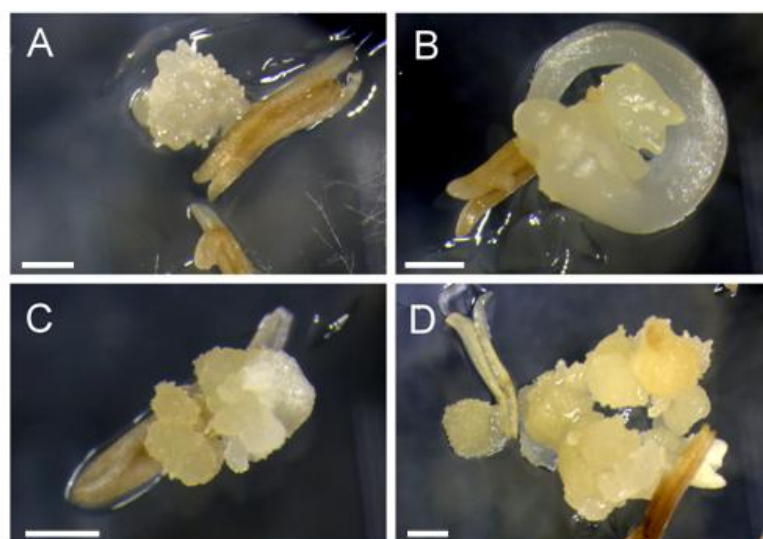
Cílem experimentu bylo zjistit schopnost indukovat androgenezi u genotypů M2, M8 a M9 v *in vitro* podmínkách za použití stresového předošetření.



Zdroj: Vlastní zpracování.

Obr. 1: Prašnickové kultury genotypů M2, M9 s tvořícími se kalusy 4 týdny od zahájení kultivace: A. M2, bez předošetření, modrá šipka označuje světle zbarvený kalus, B. M2, chladové předošetření, žlutá šipka označuje životaschopný prašník světlého zbarvení, C. M2, paraquatové předošetření, žlutá šipka označuje neživotaschopný prašník, hnědého zbarvení, modrá šipka označuje kalus nahnědlé barvy, D. M9, bez předošetření, E. M9, chladové předošetření, měřítko představuje 1 cm.

Pozn.: Prašnickové kultury po paraquatovém předošetření u genotypu M8 ani M9 nebyly dokumentovány, protože v průběhu kultivace zkontaminovaly.



Zdroj: Vlastní zpracování.

Obř. 2: Detailní zobrazení tvorby kalusů z prašníků (genotyp M2, chlad) na indukčním médiu MN6. Fotografie byly zhotoveny na binokulárním fluorescenčním mikroskopu (Leica, M165FC) 6 týdnů od začátku kultivace. A, C - růst žlutého kalusu z prašníku, B - růst kořenu z kalusu na indukčním médiu MN6, D - růst kalusu z prašníku hnědého zbarvení. Měřítka představuje 1mm.

5.1.1 Sledování viability prašníků:

V průběhu kultivace prašníků na indukčních mediích jsme sledovali viabilitu prašníků vizuálně na základě jejich tmavého (hnědého) zbarvení.

Tab. 1: Srovnání hnědnutí prašníků u jednotlivých genotypů.

Genotyp	Předošetření	Použité médium	Počet zhnědnutých prašníků/celkový počet prašníků na P. misce
M 8	Paraquat	MN6	40/50, 32/60, 55/60, 40/60, 48/60
M 9	Paraquat	MN6	20/27, 44/60, 35/40
M 2	Paraquat	MN6 + Dic. + TDZ	38/60, 45/58
M 2	Paraquat	MN6	27/60
M 2	Bez předpůsobení	MN6	28/50
M 2	Bez předpůsobení	MN6 + Dic. + TDZ	38/60
M 8	Chladové předpůsobení	MN6 + Dic. + TDZ	18/60

Zdroj: Vlastní zpracování.

Linie M8 vykazovala nejmenší životaschopnost prašnickových kultur, jež podléhaly hnědnutí, zejména v případě použití paraquatového předošetření na kultivačním médiu typu MN6. Prašníky genotypu M2 ve srovnání s genotypem M8 hnědly méně intenzivně,

což naznačuje větší životaschopnost v průběhu indukce androgeneze. Z hlediska předošetření podléhaly hnědnutí oba genotypy nejvíce při použití paraquatového předošetření. Chladové předošetření se v hnědnutí prašníků projevilo u genotypu M8, ale méně intenzivně ve srovnání s paraquatovým předošetřením tohoto genotypu. U genotypu M2 se po chladovém předošetření hnědnutí prašníků výrazně neprojevilo. Srovnání použitých kultivačních médií prokázalo, že hnědnutí na médiu MN6 bylo intenzivnější. Na médiu s přídavkem Dic. a TDZ tak často k hnědnutí nedocházelo.

Paraquatové předošetření způsobilo intenzivní hnědnutí u většiny prašníků odrůdy M2, jako vitální se jevílo pouze 10% prašníků (Tab. 1).

5.1.2 Tvorba kalusového pletiva (viz Obr.1 + Tab. 2)

Tab. 2: Tvorba kalusového pletiva u jednotlivých genotypů a předošetření.

		Počet prašníků na Petriho misce/počet kalusů		
Genotyp	Médium	Bez předošetření	Chladové předošetření	Paraquatové předošetření
M2	Médium MN6	18/12, 60/0, 60/32, 50/0	60/26, 60/0, 60/25	55/0
M2	Médium MN6 + Dic. + TDZ	60/20, 60/30, 50/10	50/30	60/5, 60/35, 40/20
M8, M9	Médium MN6	60/4, 60/0, 60/0	60/0, 60/4	-
M8, M9	Médium MN6 + Dic. + TDZ	60/10, 60/7, 60/0	60/3, 35/0	-

Zdroj: Vlastní zpracování.

5.1.2.1 Prašníky bez předošetření

Více kalusů produkovala linie M2.

Pro genotyp M2 se jevílo jako vhodné použití média MN6, na kterém se tvořilo nejvíce kalusů. Vyšší procento tvorby kalusového pletiva bylo pozorováno u více než poloviny kultivovaných Petriho misek v porovnání s kultivací na médiu s přídavkem TDZ a Dic. Kalusové pletivo bylo světlé barvy (běžové či nažloutlé). Médium MN6 + Dic. + TDZ u genotypu M2 způsobilo tvorbu kalusu u menšího počtu kultivovaných prašníků ve srovnání s kultivací na médiu MN6. Barva kalusů byla tmavší.

Genotypy M8 a M9 také indukovaly tvorbu světlých kalusů bez předošetření, avšak produkce kalusového pletiva byla méně intenzivní.

5.1.2.2 Předošetření chladem

Kalusy produkovaly oba genotypy, procentuálně větší množství kalusů bylo zjištěno u genotypu M2.

Prašníky genotypu M2 regenerovaly po chladovém předošetření do kalusového pletiva světlé barvy na médiu MN6, avšak kalusy se vyskytovaly v menším počtu než na médiu s přidavkem TDZ a Dic. Médium MN6 + Dic. + TDZ poskytovalo lepší odezvu v počtu kalusů, které však byly nahnědlé až tmavě hnědé barvy.

Stejnou odezvu měl genotyp M8(9), jenž poskytoval více, avšak tmavých kalusů na médiu s přidavkem Dic. a TDZ a celkově menší počet světlých kalusů na médiu MN6 (viz Obr. 1)

Tvorba kalusů byla zaznamenána u obou použitých médií, v přepočtu na jednu miskou byla efektivnější v tvorbě kalusů (%) linie M2.

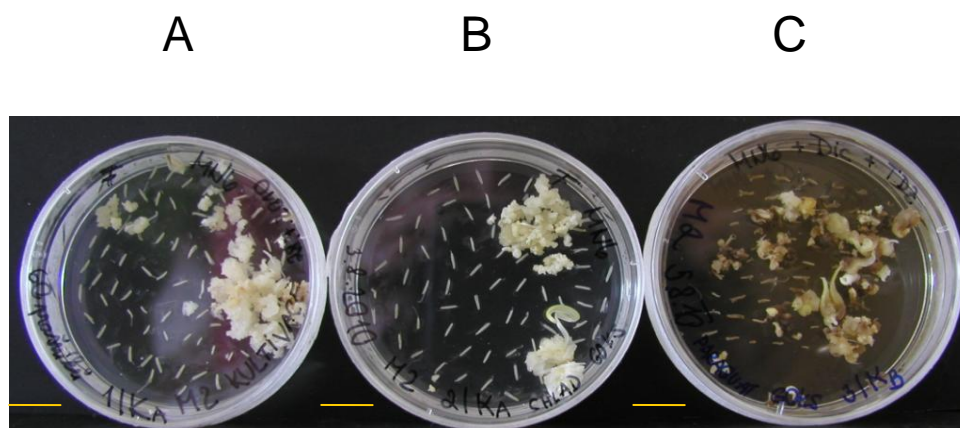
5.1.2.3 Předošetření paraquatem

Celkově se jako lepší médium pro tvorbu kalusů při tomto použitém předošetření jevílo médium MN6 + Dic. + TDZ u genotypu M2. Kalusy se tvořily na médiích obou typů, ale na médiu s přidavkem Dic. a TDZ byl vyšší procentuální výtěžek. Paraquatové předošetření mírně zvýšilo indukci u genotypu M2.

Srovnání genotypů

U genotypu M2 se kalusové pletivo tvořilo u všech typů předošetření (bez předošetření, předošetření chladem, předošetření paraquatem). Paraquatové předošetření často vedlo k tvorbě zahnědlých kalusů tmavé barvy a k oxidaci média. I takovéto hnědé kalusy byly pasážovány na regenerační médium, kdy větší množství i těchto kalusů regenerovalo v rostliny. U genotypů M8 a M9 se tvořily světlé kalusy u prašníků bez předošetření i předošetřených chladem, avšak v omezené míře. U paraquatového předošetření těchto genotypů tvorba kalusu nebyla pozorována ani během prvních týdnů kultivace.

Z hlediska kultivace byla tedy více responzibilní linie M2.



Zdroj: Vlastní zpracování.

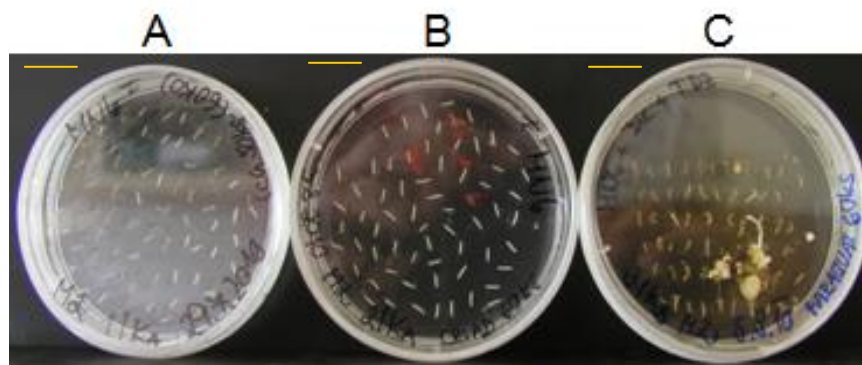
Obr. 3: Předošetření: A. M2, bez předošetření, B. M2 chladové předošetření, C. M2, paraquatové předošetření, měřítko představuje 1 cm.

Kalusy u genotypu M2 se tvořily u všech typů předošetření. Prašníky bez předpůsobení a po působení chladu tvořily kalusy hrudkovité struktury, jež se drolily a byly světlých odstínů. U předošetření paraquatem se tvořilo drobné kalusové pletivo zahnědlé barvy.

Srovnání médií: Viz Obr. 3

Na obr. 3 jsou znázorněny regenerace kalusů odrůdy M2 na MN6 médiu bez předošetření a po předošetření chladem (A, B). Prašníky předošetřené paraquatem lépe tvořily kalus na médiu MN6 + Dic. + TDZ (C).

U všech typů předošetření se však vyskytovaly prašníky, které pomocí předošetření nebyly indukované k procesu androgeneze (viz Obr. 4).



Zdroj: Vlastní zpracování.

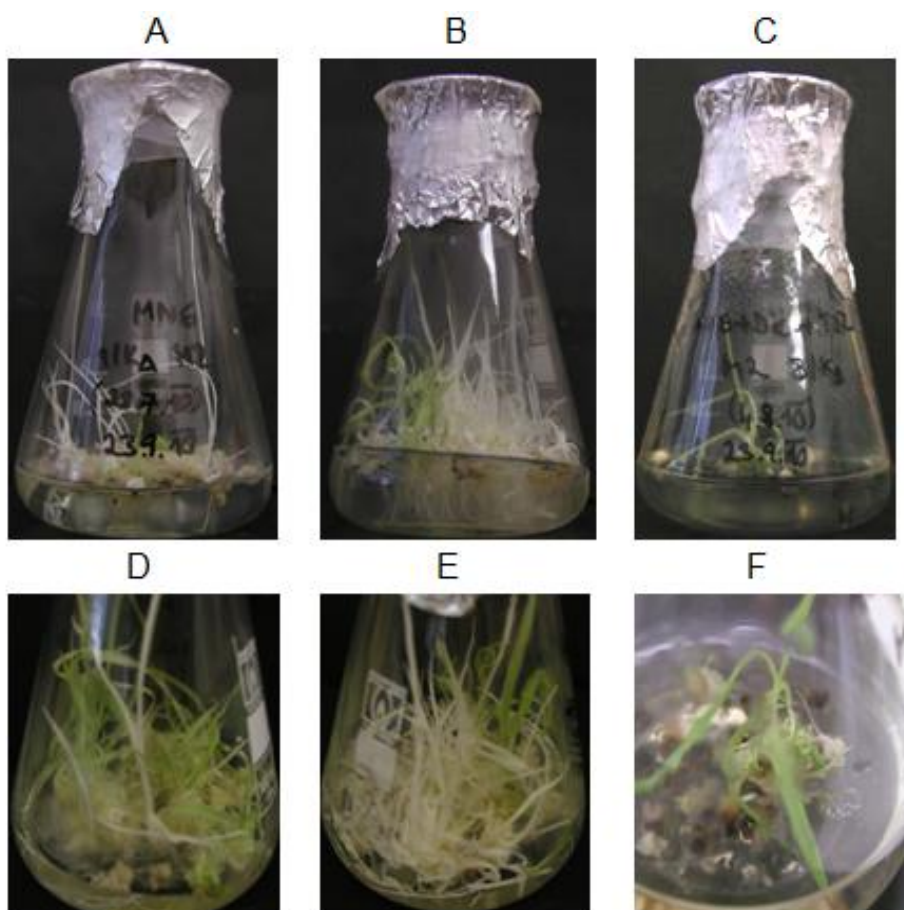
Obr. 4: A. M2, bez předošetření, B. M2, chladové předošetření, C. M2, paraquatové předošetření, měřítko představuje 1 cm.

Z uvedených výsledků vyplývá, že ve většině případů lépe prospívaly prašníky kultivované na médiu MN6 ve srovnání s médiem MN6 + TDZ + Dic. Prašníky bez předošetření či prašníky předošetřené chladem vykazovaly efektivnější tvorbu kalusů ve srovnání s kultivací prašníků předošetřených paraquatem.

Kalusy byly pasážovány na regenerační médium asi po 4 týdnech.

Již po 6 dnech kultivace na regeneračním médiu byla pozorována regenerace malých rostlin se zelenými nebo albikátními listy. Některé rostliny vykazovaly i růst kořenů.

5.1.3 Regenerace kalusů do rostlin



Zdroj: Vlastní zpracování.

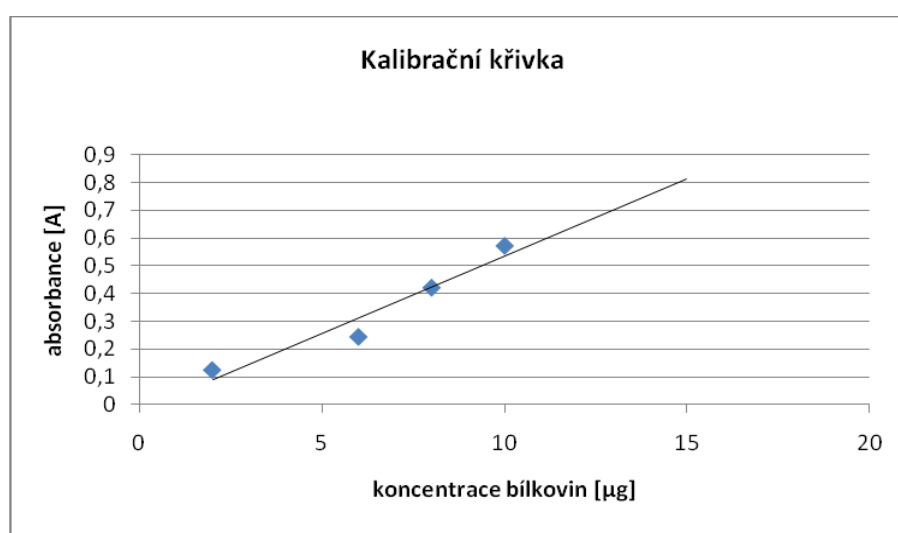
Obr. 5: Regenerace kalusů do rostliny: A. M2, bez předošetření, B. M2, chladové předošetření, C. M2, paraquatové předošetření, D. detail, M2 bez předošetření, E. detail, M2, chladové předošetření, F. detail, M2, paraquatové předošetření.

Do celistvých rostlin lépe regenerovaly kalusy genotypu M2 z prašníků bez předošetření a ošetřených chladovým předošetřením ve srovnání s prašníky ošetřenými roztokem paraquatu.

U regenerovaných rostlin genotypu M2 (bez předošetření a předošetření chladem) byl však mnohem vyšší výskyt albinotických rostlin (Obr. 5), než u regenerantů předošetřených paraquatem (většina rostlin zelených). Genotyp M8 a M9 regeneroval z kalusů bez předošetření a po předošetření chladem méně intenzivně než genotyp M2.

5.2 Izozymové analýzy

Stanovení obsahu bílkovin ve vzorcích:



Zdroj: Vlastní zpracování.

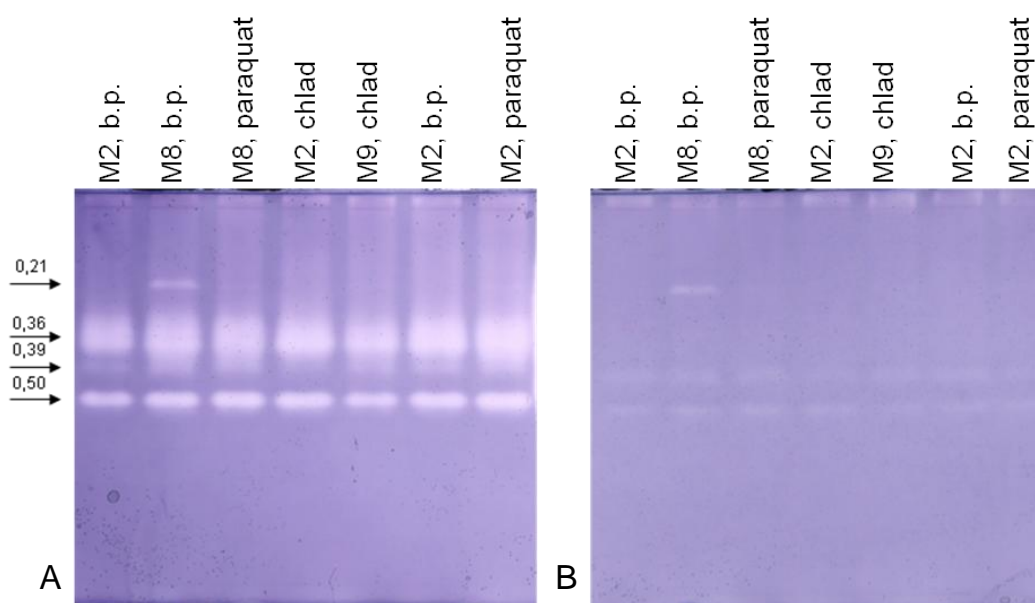
Obr. 6: Kalibrační křivka.

Tab. 3: Naměřené hodnoty absorbance [A] a koncentrace bílkovin v objemu 2 µl.

Vzorek	Hodnoty absorbance [A]	Koncentrace bílkovin ve 2 µl
1.	0,698	11,517
2.	1,194	19,701
3.	0,800	13,211
4.	0,815	13,448
5.	0,809	13,349
6.	0,864	14,256
7.	0,834	13,761

Zdroj: Vlastní zpracování.

5.2.1 Superoxiddismutáza



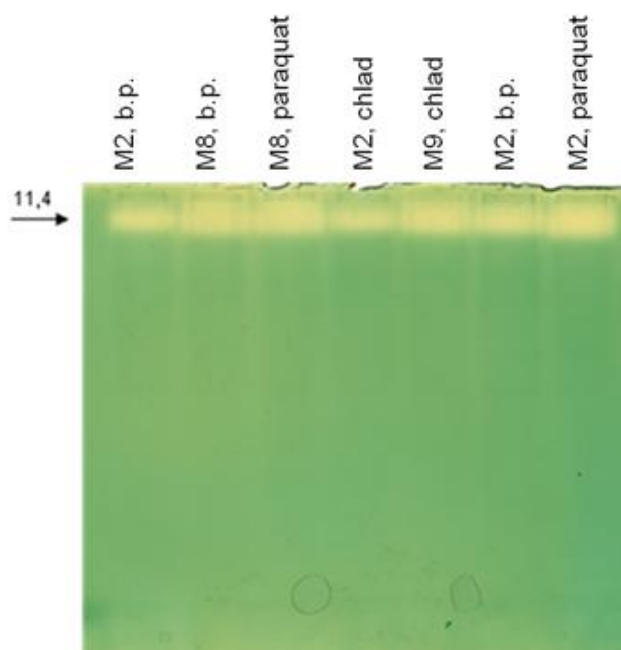
Zdroj: Vlastní zpracování.

Obr. 7: Izozymové složení SOD. A. bez inhibice H₂O₂, B. s inhibicí H₂O₂. Šipky označují izozymy SOD s různými retenčními faktory (Rf).

Zjistili jsme změny ve složení SOD izozymů v závislosti na genotypu a typu předošetření. Izozym s Rf 0,21 byl aktivní jen v případě genotypu M8. Po předošetření paraquatem byla aktivita tohoto izozymu inhibována (Obr. 7A, dráha 3). Na základě jeho rezistence vůči peroxidu (Obr. 7B, dráha 2) bylo navrženo, že se jedná o MnSOD.

Variabilita byla také zjištěna v případě izozymu s Rf 0,39. Tento izozym vykazoval v prašnicích genotypu M8 vyšší aktivitu v porovnání s genotypem M2. U tohoto izozymu se projevila také rozdílná odpověď na paraquatové předošetření, přičemž v případě genotypu M8 se aktivita izozymu neměnila (Obr. 7A, dráhy 2,3), naopak v případě genotypu M2 byla odhalena značná indukce (Obr. 7A, dráhy 1,7). Předošetření chladem nemělo významný vliv na aktivitu tohoto izozymu u žádného ze studovaných genotypů. Podobně jako izozym Rf 0,21, i tento izozym mohl být identifikován jako MnSOD na základě jeho rezistence vůči peroxidu vodíku.

5.2.2 Kataláza

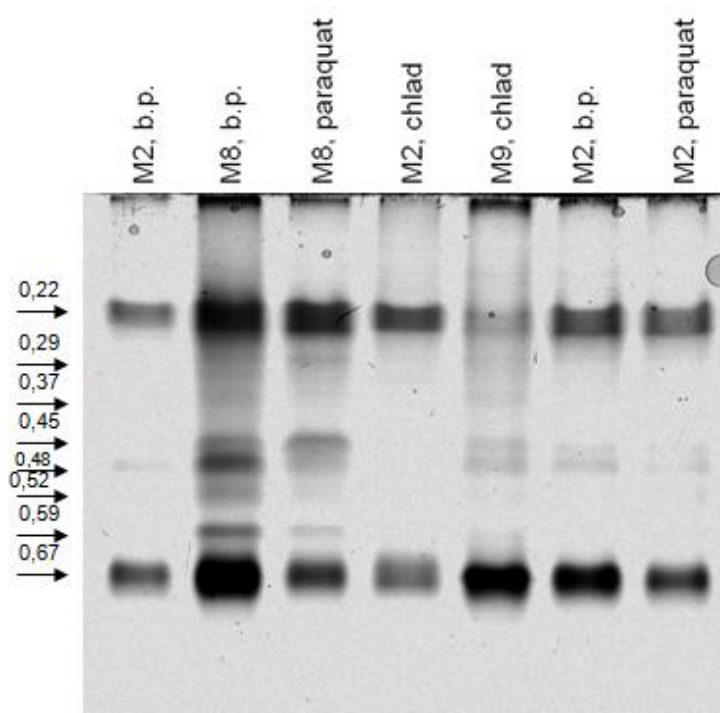


Zdroj: Vlastní zpracování.

Obr. 8: Izozymové složení CAT v prašnicích ječmene genotypů M2, M8 a M9 bez předošetření (b. p.), po předošetření chladem a roztokem paraquat.

Kataláza byla u všech genotypů zastoupena jedním izozymem s Rf 11,4. Jeho aktivita se lišila v závislosti na genotypu, přičemž prašníky genotypu M8 měly vyšší aktivitu katalázy v porovnání s genotypem M2. Předošetření paraquatem nezpůsobilo žádné změny v aktivitě tohoto izoenzymu u genotypu M8, zatímco u genotypu M2 byla zjištěna indukce jeho aktivity. Chladové předošetření nezpůsobilo žádné významné změny v katalázové aktivitě.

5.2.3 Peroxidázy



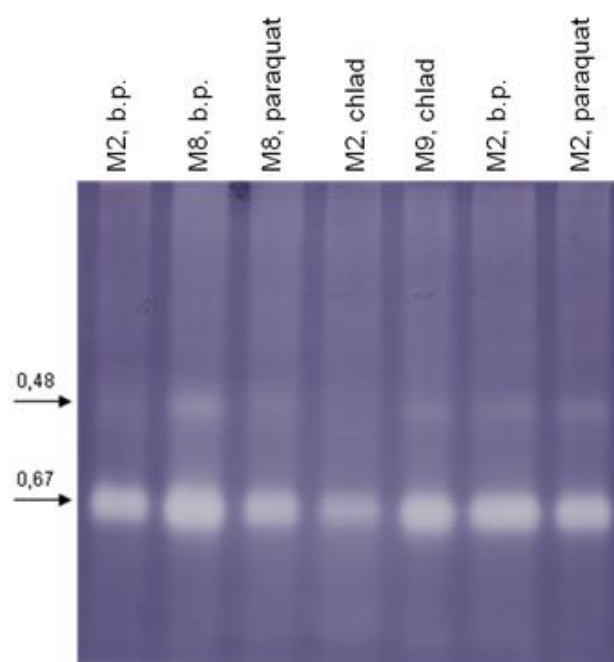
Zdroj: Vlastní zpracování.

Obr. 9: Izozymové složení PEX v prašnicích ječmene genotypů M2, M8 a M9 bez předošetření (b. p.), po předošetření chladem a roztokem paraquatu.

Peroxidázová aktivita vykazovala změny závislé na genotypu i typu předošetření.

Rozdíly mezi genotypy byly především v přítomnosti izozymu s Rf 0,22, který byl u genotypu M8 silně aktivní v porovnání s genotypem M2 (Obr. 9, dráha 1, 2). Dále pak v přítomnosti izozymů s Rf 0,48 a 0,67, jež byly indukovanější také u genotypu M8 (Obr. 9, dráha 1, 2). Rozdíly jsme také pozorovali v odpovědi na paraquatové předošetření. Zatímco v genotypu M2 peroxidázy neměnily svou izozymovou strukturu a ani aktivitu (Obr. 9, dráhy 1, 7), izozymy s Rf 0,48, 0,52, 0,59 a 0,67 u genotypu M8 výrazně snížily svou aktivitu v přítomnosti paraquatu (Obr. 9, dráhy 2, 3). Chladové předošetření nemělo výrazný vliv na aktivitu izozymu v prašnicích M2 (Obr. 9, dráhy 1, 4).

5.2.4 Askorbátperoxidáza

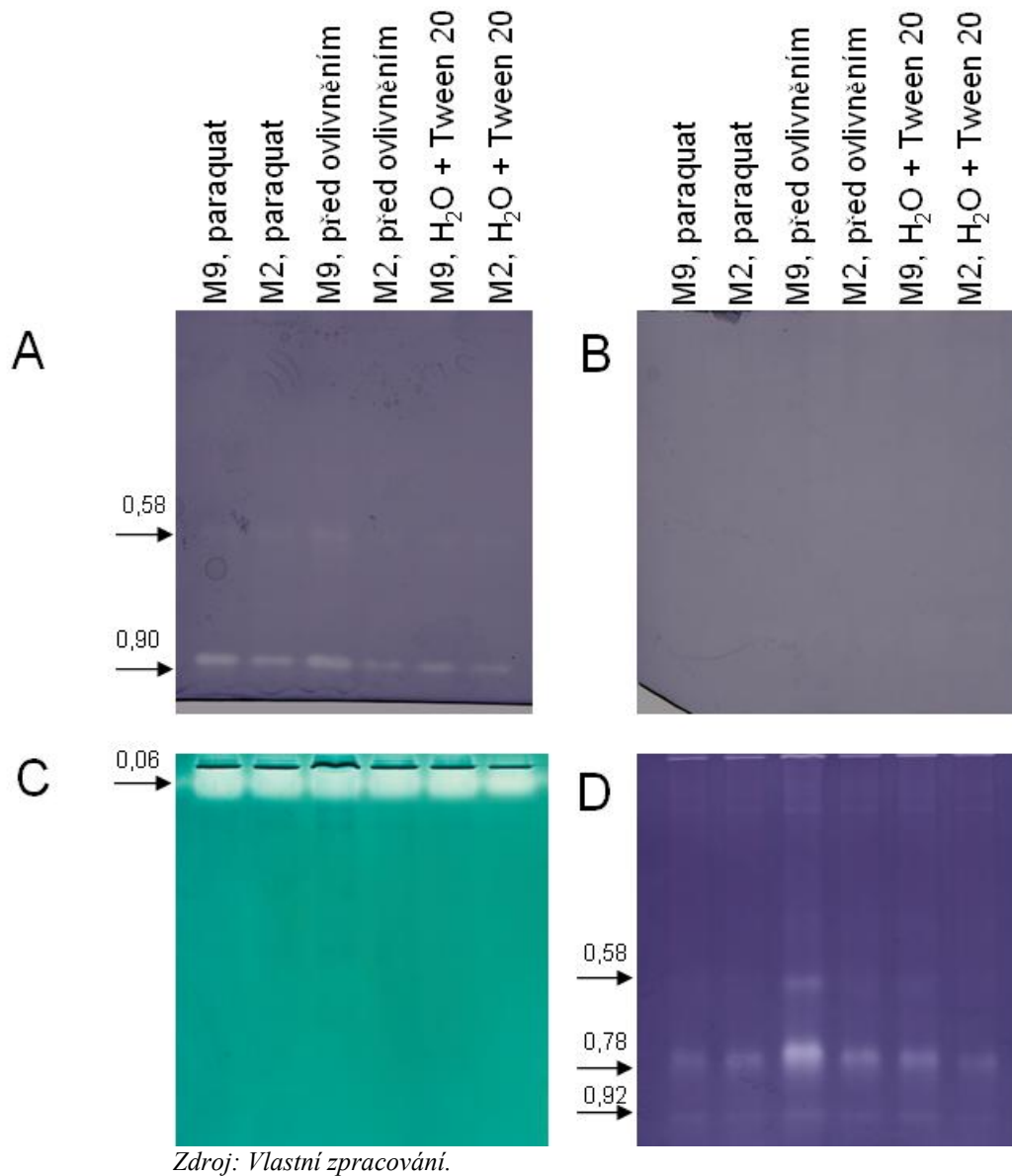


Zdroj: Vlastní zpracování.

Obr. 10: Izozymové složení APX v prašnicích ječmene genotypů M2, M8 a M9 bez předošetření (b. p.), po předošetření chladem a roztokem paraquat.

Z obr. 10 je patrné, že izozym s Rf 0,48 byl u genotypu M8 konstitutivně aktivní (Obr. 10, dráha 1, 2), u genotypu M2 bylo možné pozorovat indukci paraquatovým předošetřením (Obr. 10, dráha 7). Tento izozym byl u genotypu M8 paraquatovým předošetřením inhibován (Obr. 10, dráha 2,3). Aktivita izozymu s Rf 0,67 se lišila v závislosti na genotypu, přičemž prašníky genotypu M8 měly vyšší aktivitu askorbátperoxidázy v porovnání s genotypem M2. Předošetření paraquatem nezpůsobilo žádné změny v aktivitě tohoto izozymu u genotypu M2 (Obr. 10), zatímco u genotypu M8 byla zjištěna inhibice jeho aktivity. Chladové předošetření způsobilo změny v závislosti na použitém genotypu, kdy prašníky genotypu M2 vykazovaly silnou inhibici tohoto izozymu.

5.2.5 Superoxiddismutáza, kataláza a askorbátperoxidáza v listovém pletivu



Obr. 11: Izozymové složení antioxidantních enzymů v listech genotypů M2 a M9.

(A. SOD bez inhibice H₂O₂, B. SOD s inhibicí, C. CAT, D. APX)

Na gely byl aplikován stejný obsah bílkovin jako v případě prašníků. U izozymového složení SOD v listech jsme pozorovali rozdíl mezi genotypy v intenzitě obou detekovaných izozymů (Obr. 11A, dráha 1 a 2), přičemž izozymy genotypu M9 u prašníků vykazovaly vyšší aktivitu. Ovlivnění listů paraquatem změnilo především aktivitu izozymu s Rf 0,58 (inhibice), a to jenom u genotypu M9. Oba izozymy jsou patrně Cu/Zn SOD, protože byly peroxidem vodíku inhibovány. Domníváme se, že izozym

s Rf 0,58 může být shodný s izozymem s Rf 0,50 u prašníků, i když se liší v rezistenci na peroxid vodíku. Tento rozdíl může být způsoben nižší aktivitou SOD v listech než v prašnicích.

Katalázová aktivita při srovnání prašníků a listů se výrazně nelišila. Také v listech byla kataláza zastoupena jedním izozymem pro všechny genotypy a typy předošetření. Narozdíl od prašníků, ovlivnění paraquatem nemělo žádný vliv na intenzitu detekovaného izozymu.

U APX izozym identifikovaný u prašníků s Rf 0,48 pravděpodobně odpovídá izozymu u listů s Rf 0,58, kdy oba genotypy M8 i M9 bez předošetření vykazovaly stejnou aktivitu tohoto izozymu při porovnání listového a prašnickového pletiva. U listů byl tento izozym inhibován v případě paraquatového předošetření u genotypu M9. U genotypu M2 se jeho aktivita neměnila. Izozym s Rf 0,78 u listů odpovídá izozymu s Rf 0,67 u prašníků a vysoká aktivita izozymu byla zaznamenána u genotypů M8 a M9 bez předošetření. U listového pletiva byl indukován ještě jeden izozym s Rf 0,92, který byl detekován pro všechny genotypy a předošetření, ale který byl významně aktivní pouze u genotypu M9 bez předošetření.

6 DISKUZE

Studium procesu androgeneze za účelem zisku haploidních rostlin je složitým problémem šlechtitelského programu. Jako vhodné se jeví použití prašnickových kultur či kultur izolovaných mikrospor, jež přináší efektivní výsledky (Jacquard a kol., 2009).

V našich experimentech jsme využili prašnickových kultur dvou dihaploidních linií jarního ječmene, genotypy Golden promise (označeno M8, M9) a dihaploidní linii novošlechtění 122/60 (označena jako genotyp M2) ze ZVÚ Kroměříž. Proces indukce androgeneze je procesem citlivým k řadě faktorů. Bylo prokázáno, že na efektivitu androgeneze má značný podíl genotyp dárcovské rostliny (Smýkal, 2000, Datta, 2005, Preťová a kol., 2006, Muñoz-Amatriaín a kol., 2009, Zur a kol., 2009), což bylo potvrzeno i v našich experimentech, kdy se jako responzibilnější k androgenetické indukci (vyjádřenou tvorbou kalusového pletiva) jevila dihaploidní linie M2 ve srovnání s linií Golden promise.

Aktuálním problémem při aplikaci androgeneze je předošetření biologického materiálu, jež má vést k přeprogramování cesty gametofytické na cestu sporofytickou za účelem zvýšené indukce androgeneze a následné tvorby haploidních rostlin (Preťová a kol., 2006, Jacquard a kol., 2009, Zur a kol., 2009). Může být použito několik typů předošetření jako je např. působení nízkých či vysokých teplot (Smýkal, 2000, Shariatpanahi a kol. 2006, Zur a kol., 2009) či metabolické hladovění (Datta, 2005, Shariatpanahi a kol. 2006, Zur a kol., 2008, 2009). Působení abiotického a biotického stresu se podílí na procesu androgeneze (Zur a kol., 2008), je však také známo, že tyto nepříznivé vlivy způsobují v rostlinném organismu oxidační stres a tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů. Proto byl v našich experimentech vyvolán oxidační stres pomocí chemického působení paraquatu a následně zjišťován vliv paraquatového předošetření na indukci androgeneze. V našich experimentech bylo použito i chladové předošetření 4 °C, jemuž byly vystaveny klasy primárních odnoží po dobu 14ti dnů. Jako druhý typ předošetření jsme provedli předošetření 10μmol/l roztokem paraquatu, který byl aplikován na sterilní vyizolované prašníky od obou dihaploidních responzibilních linií. Bylo zjištěno, že vliv předošetření byl silně vázán na typ média a také typ použitého genotypu. Předošetření tedy mělo značný vliv na efektivitu androgenetické indukce, což potvrzují i studie dalších autorů např. Zur a kol. (2008). Vyskytuje se však i fakt, že androgenezi podléhají i mikrospory v kultuře *in vitro* bez jakéhokoli předošetření (Kruczkowska a kol.,

2002, Fehér a kol., 2008). Tento jev byl detekován i v případě našich kultur, kdy obě linie tvořily androgenetické kalusové pletivo (adekvátně podle své rezpozivity) i u prašníků bez předošetření. To může znamenat, že i samotná manipulace s prašníky mohla způsobit stres a následně vést k tvorbě kalusového pletiva.

Předošetření paraquatem u genotypů M8 a M9 narozdíl od genotypu M2 snížilo efektivitu indukce. Takto předošetřené prašníky byly neživotaschopné a odumíraly. Tvorba kalusového pletiva nebyla pozorována. Toto naznačuje sníženou odolnost genotypů M8 a M9 vůči oxidačnímu stresu a rovněž fakt, že odolnost vůči stresu může souviset s androgenní odpovědí genotypů.

V experimentech Zur a kol. (2008, 2009) chladové předošetření zvýšilo viabilitu mikrospor *tritikale* (kultivary Miezsko a Wanad) v porovnání s mikrosporami, které nebyly předošetřeny. Bez chladového předošetření mikrospory nezahájily androgenetickou indukci. V našich experimentech, však androgenetickou indukci zahájily i prašníky bez chladového předošetření, stejně tak prašníky předošetřené chladem, přitom jsme nezjistili výrazný rozdíl v intenzitě tvorby kalusu, ani viabilitě prašníků bez předpůsobení a předpůsobených chladem. To může znamenat, že chladové předošetření v našich experimentech nezpůsobilo dostatečný stres na zvýšení indukce. Toto tvrzení však vyžaduje další cílené experimenty jako např. použití různých chladových teplot či period chladového působení.

Na hnědnutí a snížení životaschopnosti mělo vliv i kultivační médium, kdy médium typu MN6 vykazovalo intenzivnější snížení viability u obou použitých genotypů v porovnání s modifikovaným médiem MN6 s přísadkou Dic. a TDZ. Proto usuzujeme, že přísadka hormonu auxinového typu, Dicamby a také hormonu cytokininového typu, thidiazuronu měl pozitivní vliv na viabilitu kultivovaných prašníků.

V posledních letech se diskutuje otázka úlohy oxidativního stresu a ROS v průběhu vývinových procesů rostlin. ROS se podílejí na vnímání stresu a jejich hromadění aktivuje antioxidační systém (Jacquard a kol., 2009). V našich experimentech byla experimentálně pomocí diskontinuální polyakrylamidové elektroforézy sledována aktivita antioxidačních izozymů, a to konkrétně superoxidodismutázy, katalázy, peroxidáz a askorbát oxidázy v tkáních prašníků u genotypů M2, M8 a M9 po použití chladového a paraquatového předošetření. Pro srovnání byla aktivita těchto enzymů identifikována i v listovém neembryogenním pletivu, jež bylo předošetřeno roztokem paraquatu o stejné koncentraci.

Naším cílem bylo porovnat rozdíly ve složení izozymů při různém indukčním stresu i účinnosti androgeneze.

Superoxiddismutáza je enzym, jenž odbourává superoxid za vzniku peroxidu. Vyšší androgenetická rezpozivita např. u kultivaru Miezsko byla podmíněna vyšší aktivitou SOD, v porovnání s méně androgenním kultivarem Wanad (Zur a kol., 2009). Podobně jsme v našich experimentech zjistili rozdíl v izozymovém složení SOD mezi genotypy, což může indikovat možné využití tohoto enzymu pro detekci androgenetické rezpozivity. V této souvislosti je zajímavé i zvýšení izozymu s Rf 0,21 (MnSOD) u genotypu M2 po použití paraquatového předošetření, což vedlo k zvýšení androgenetické odpovědi. MnSOD hraje roli také ve vývinových procesech (Morgan a kol., 2008) a naše výsledky přinášejí důkaz o jeho funkci i v procesu androgeneze.

Aktivita izozymu CAT v prašnicích byla v našich experimentech ovlivněna genotypem i typem předošetření. Proti tomu aktivita CAT v prašnicích, které nebyly předošetřené, jsme zaznamenali negativní korelaci v závislosti na rezpozivitě kultivaru. Odpověď izozymu katalázy na předošetření paraquatem pozitivně souvisela s tvorbou kalusového pletiva. Proto zvýšená androgenní rezpozivita M2 po paraquatovém předošetření může být spojována s nárůstem aktivity katalázy v těchto prašnicích. V listovém pletivu jsme podobný trend nepozorovali, což naznačuje možné specifické spojení s androgenezí. Naše výsledky se ovšem neshodují s výsledky Zur a kol. (2009), ve kterých aktivita CAT nebyla genotypem *tritikale* nijak ovlivněna. Enzym APX, který také odbourává v rostlinném pletivu peroxid vodíku, při paraquatovém předošetření u genotypu M2 vykazoval stejný trend jako kataláza, jejíž aktivita byla zvýšena. Předpokládáme tedy, že androgenní odpověď genotypů souvisí s enzymatickou kapacitou pro degradaci peroxidu vodíku v prašnicích.

Z experimentů lze vyvodit určitý řetězec návazných reakcí, kdy při paraquatovém předošetření byla viditelná indukce SOD, což mohlo způsobit nárůst hladiny peroxidu vodíku. Peroxid vodíku byl následně odbouráván katalázou, jejíž aktivita byla také zvýšena přítomností paraquatového předošetření. Tento mechanismus pravděpodobně podnítil zvýšení indukce androgeneze po paraquatovém předošetření. Tato zvýšená tvorba kalusového pletiva při předošetření je v souladu s pozitivním vlivem ROS na buněčné dělení (Fehér a kol., 2008).

Změny v aktivitě izozymu peroxidáz nevykazují přímou souvztažnost s androgenní odpovědí ječmene v našich experimentech. V prašnicích genotypu M2 předošetření nemělo žádný vliv na aktivitu peroxidáz, přičemž docházelo (při paraquatovém předošetření) k zvýšení androgenní odpovědi. Peroxidázy v méně responzibilních prašnicích genotypu M8 byly paraquatovým předošetřením inhibovány. Narozdíl od našich výsledků, snížená aktivita PEX v mikrosporách *tritikale* poukazuje na zapojení H_2O_2 do indukce androgenetické odpovědi (Zur a kol., 2008, 2009). Naše výsledky spíše naznačují, že peroxidázy jsou zodpovědné za jiné funkce v průběhu androgeneze např. buněčnou smrt, protože odbourávání peroxidu vodíku je zabezpečováno CAT a APX.

7 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byl na základě dostupných literárních zdrojů zhodnocen aktuální stav poznatků v tématice oxidačního stresu u rostlin obecně a v souvislosti s vývojovými procesy s důrazem na indukci *in vitro* androgeneze. Hlavním cílem práce bylo identifikovat schopnost indukce androgeneze u dvou genotypů při různých podmínkách použitého předošetření, a to použití chladového nebo paraquatového předošetření či použití prašníků bez předošetření.

1. Výsledky našich experimentů prokázaly, že předošetření hraje významnou roli v procesu androgenetické indukce. Avšak, je nutno podotknout, že pouhá manipulace s prašníky mohla být stresujícím faktorem, který vyvolal indukci.
2. Efekt předošetření byl závislý na typu použitého genotypu donorové rostliny, stejně tak na typu použitého předošetření.
3. Účinek předošetření měl vliv i na viabilitu prašnickových kultur.
4. Byl také potvrzen vliv použitého indukčního média na viabilitu kultivovaných mikrospor.
5. U testovaných genotypů byla identifikována odlišná schopnost indukce androgeneze, jež byla vázána zejména na aktivitu enzymů SOD, CAT a APX.
6. Významným objevem bylo zapojení MnSOD do mechanismu indukce androgeneze.
7. Paraquatové předošetření podnítilo zvýšenou schopnost genotypů k androgenezi.
8. Porovnání změn ve složení izozymů antioxidantních enzymů při různých podmínkách indukčního stresu vedlo k závěru, že androgenetická odpověď genotypu je spjata se schopností enzymatické degradace kyslíkových radikálů, jež se tvořily během vytvořených stresových podmínek.

Řešení problému androgenetické indukce není zdaleka u konce. Je možné provést ještě řadu cílených experimentů, které podle našeho doporučení mohou například zařadit výzkum reakce schopnosti androgeneze v případě použití různých koncentrací paraquatu. Dalším možným pokračováním může být přesná lokalizace enzymu MnSOD v prašníku s použitím imunofluorescence, mikroskopických metod jako je konfokální mikroskopie či vizualizace enzymu prostřednictvím metody GFP (green fluorescein protein – zeleně fluoreskujícího proteinu). Větší pozornost výzkumu si zaslouží i chladové předošetření a jeho vliv na indukci androgeneze.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C.** (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, (2002) VOL. 82, 1227-1238.
- [2] **Bohanec, B.** : Chapter 2 Doubled Haploids *via* Gynogenesis 35-47, Ed.: Touraev, A., Forster, P., Jain, S. M.: Advances in Haploid Production in Higher Plants. *Springer Science + Business Media* B. V., 2009. [ISBN: 978-1-4020-8853-7].
- [3] **Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 72:248 –254.
- [4] **Březinová Belcredi, N., Ehrenbergerová, J., Prýma, J., Havlová, P.** (2007): Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutasy pomocí soupravy RANSOD v rostlinném materiálu. *Chem. Listy* (2007) 101, 504–508.
- [5] **Datta, S. K.** (2005): Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* (2005), VOL. 89, 1870-1878.
- [6] **Fehér, A., Ötvös, K., Pasternak, T. P., Szandtner, A. P.** (2008): The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior* (2008) 3:10, 823-826.
- [7] **Foyer, Ch. H., Noctor, G.** (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* (2005) 28, 1056–1071.
- [8] **Garda, J.** (1967): *Lipnicovité* 122-124, Soustavná botanika. SPN, Praha.
- [9] **Gucciardo, S., Wisniewski, J. P., Brewin, N. J., Bornemann, S.** (2007): A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany*. (2007) Vol. 58, No. 5, pp. 1161–1171.
- [10] **Chu, C. C.** (1981): The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Proc. sym. plant tissue culture, Beijing 1978, Pitman, Boston, pp 43–50.
- [11] **Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Boutilier, K., Baillieul, F., Clément, Ch.** (2009): Microspore embryogenesis in barley: anther pre-treatment stimulates plant defence gene expression. *Planta* (2009) 229:393–402.

- [12] **Jurčák, J.** (2007): *Generativní orgány*. Anatomie vyšších rostlin. Komentovaný atlas. Nakladatelství Veselý. [ISBN: 80-86376-39-7].
- [13] **Kruczkowska, H., Pawłowska, H., Skucińska, B.** (2002): Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *J. Appl. Genet.* 43(3), 2002, 287-296.
- [14] **Lekeš, J.** (1997): Šlechtění obilovin na území Československa. Brázda, s. r. o., Praha.
- [15] **Li, H., Devaux, P.** (2003): High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science* (2003) 164; 379-386.
- [16] **Maraschin, de F. S., 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* (2005), Vol. 56, No. 417, pp. 1711–1726.
- [17] **Maraschin, de F. S., Caspers, M., Potokina, E., Wülfert, F., Graner, A., Spaink, H. P., Wang, M.** (2006): cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum* (2006), 127: 535–550.
- [18] **McCormick, S.** (1993): Male Gametophyte Development. *The Plant Cell* (1993), Vol. 5, 1265-1275.
- [19] **Morgan, M. J., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Baxter, C. J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T. C. R., Schauer, N., Hernie, A. R., Fricker, M. D., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Finkemeier, I.** (2008): Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol* (2008) 147(1):101-114.
- [20] **Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Close, T. J., Vallés, M. P.** (2009): Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Funct Integr Genomics* (2009) 9:311–323.
- [21] **Murashige, T., Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* (1962) 15:473–497.
- [22] **Ohnoutková, L.** (2000): Disertační práce: Techniky indukce haploidního a polyhaploidního materiálu *in vitro* u obilnin. Fakulta agronomická, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Olomouc.

- [23] Pasternak, T. P., Ötvös, K., Domoki, M., Fehér, A. (2007): Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regul* (2007) 51:109–117.
- [24] Pauk, J., Manninen, O., Mattila, I., Salo, Y., Pulli, S. (1991): Androgenesis in hexaploid spring wheat F₂ populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breed.* (1991) 107: 18-27.
- [25] Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* (2005) 99, 455 – 466.
- [26] Preťová, A., Obert, B., Bartošová, Z. (2006): Haploid formation in maize, barley, flax, and potato. *Protoplasma* (2006) 228: 107–114.
- [27] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., a kol. (1998): Fyziologie rostlin. Academia, Praha. [ISBN: 80-200-0586-2].
- [28] Racek, J., Holeček, V. (1999): Enzymy a volné radikály. *Chem. Listy* (1999) 93,11A – 780.
- [29] Seguí-Simarro, J. M. (2010): Androgenesis Revisited. *Bot. Rev.* The New York Botanical Garden (2010), 76:377–404.
- [30] Shariatpanahi, M. E., Bala, U., Heberle-Borsa, E., Touraev, A. (2006): Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum* (2006) 127: 519–534.
- [31] Smýkal, P. (2000): Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status a future prospects. *Biologia Plantarum* (2000) 43 (4): 481- 489.
- [32] Taiz, L., Zeiger, E. (2010): Chapter 26 Stress Psysiology 755-779, *Plant Physiology. Fifth Edition.* Publishers Sunderland, Massachusetts, USA. [ISBN: 978-0-87893-866-7].
- [33] Tenhola-Roininen, T., Tanhuanpää, P., Immonen, S. (2005): The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica* (2005) 145: 1-9.
- [34] Vagera, J., Ohnoutková, L. (1993): *In vitro* induction of androgenesis in wheat and barley. *Rostl. Vým. (Plant Production)*. (1993) 39 (2): 97-114.

- [35] **Van Breusegem, F., Bailey-Serres, J., Mittler, R.** (2008): Unraveling the Tapestry of Networks Involving Reactive Oxygen Species in Plants. *Plant Physiology* (2008), VOL. 147, pp. 978-984.
- [36] **Vančurová, R., Kühn, F.** (1966): *Lipnicovité. Zemědělská botanika 3. Systematika rostlin.* Praha.
- [37] **Wędzony, M., Forster, B. P., Zur, I., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., Gołębiowska, G.** (2009): Chapter 1 Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants 1-35, Ed.: Touraev, A., Forster, P., Jain, S. M.: *Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media B. V.*, 2009. [ISBN: 978-1-4020-8853-7].
- [38] **Wrobel, J., Barlow, P. W., Gorka, K., Nabiałkowska, D., Kurczynska, E. U.** (2011): Histology and symplasmic tracer distribution during development of barley androgenic embryos. *Planta* (2011), DOI 10.1007/s00425-010-1345-0.
- [39] **Zhuang, J. J., Xu, J.** (1983): Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H, Vega MR (eds) *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press* (1983), Beijing, p 431.
- [40] **Zur, I., Dubas, E., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Janowiak, F., Wędzony, M.** (2008): Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2008) 94:319-328.
- [41] **Zur, I., Dubas, E., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Janowiak, F., Gołębiowska, G., Wędzony, M.** (2009): Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (*x Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Rep* (2009) 28:1279–1287.
- [42] **Žárský, V., Luštinec, J.** (2005): *Úvod do fyziologie vyšších rostlin.* Karolinum, Praha. [ISBN: 80-246-0563-5]
- [43] **www.molecular-plant-biotechnology.info** [online] cit.[2011-03-20]. Dostupné z: <http://www.molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/pollen-culture.htm>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA – kyselina abscisová

aj. – a jiné

APS – Ammonium persulfate – persíran amonný

apod. – a podobně

atd. – a tak dále

BAP - 6-benzylaminopurin

BIS – N, N' – methylenbisakrylamid

CAT – kataláza

cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina

DH – dihaploidní linie

DH GPUK – dihaploidní linie Golden promise

dH₂O – destilovaná voda

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ELFO – elektroforéza

GFP – zelený fluorescenční protein

GSH – glutathion

GSSG – oxidovaný glutathion

HCl – kyselina chlorovodíková

hod. – hodina

H₂O₂ – peroxid vodíku

IAA – indolyl-3-octová

KCN – kyanid draselný

KI – kinetin

ks – počet kusů

M2, M8, M9 – použité odrůdy ječmene

min. – minuta

MN6 – označení kultivačního média daného složení

MN6 + Dic. + TDZ – označení kultivačního média s přídavkem Dicamby a thidiazuronu

n – haploidní sada chromozomů

N6 – označení kultivačního média daného složení

NAA - 1-naftalenoctová kyselina

NaClO – chlornan sodný

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NaHPO₄ – hydrogenfosforečnan sodný
NaH₂PO₄ · 2H₂O – dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného
Např. - například
NBT – nitrobluetetrazolium chlorid
obr. - obrázek
ot./min. – otáčky za minutu
P I – příloha I
P II – příloha II
PBS - *Phosphate Buffered Saline* – fosfátový pufr s 0,15M NaCl, pH 6,8-8,8
PEX - peroxidázy
pozn. – poznámka
PR – označení regeneračního média daného složení
Rf – retenční faktor
RNA – ribonukleová kyselina
ROS (AOS) – reaktivní kyslíkové radikály
SDS – dodecylsírán sodný
S₂O₈²⁻ - peroxodisíranový anion
SOD – superoxididismutáza
s. r. o. – společnost s ručením omezeným
Tab. - tabulka
TEMED – N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
TRIS - tris(pentafluorofenyl)boran
TRITON - t-octylphenoxypolyethoxyethanol
tzv. – tak zvané
ZVÚ – zemědělský výzkumný ústav
2n – diploidní sada chromozomů
2, 4-D – 2, 4-dichlorfenoxyoctová kyselina
°C – stupně Celsia

SEZNAM CHEMIKÁLIÍ

Acetokarmín
Akrylamid/bisakrylamid
Albumin
Askorbát
Bradfordovo činidlo
Bromfenolová modř
Destilovaná voda
Dicamba
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného
EDTA
Elektrodotový pufr (running buffer)
Ethanol
Extrakční fosfátový pufr pH 7,0; 7,8
Ferrikyanid
Ferrichlorid
Glycin
Glycerol
Hydrogenfosforečnan sodný
Chlornan sodný
Izopropanol
Kapalný dusík
KI
Kyselina chlorovodíková
Kyselina octová
Maltóza
Methanol
NAA
Na-fosfátový pufr pH 7,0 – 7,8
NBT - Nitrobluetetrazolium chlorid
Paraquat = methyl viologen
PBS pufr pH 6,8 – 8,8
Peroxid vodíku
Persíran amonný

Riboflavin

Síran měďnatý

TEMED - N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin

Thidiazuron

TRIS HCl pH 6,8 - 8,8

TRIS

TRITON

TWEEN 20

2, 4-D

4-Cl-1-naftol

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Srovnání hnědnutí prašníků u jednotlivých genotypů.....	44
Tab. 2: Tvorba kalusového pletiva u jednotlivých genotypů a předošetření.....	45
Tab. 3: Naměřené hodnoty absorbance [A] a koncentrace bílkovin v objemu 2 μ l.....	49

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Složení základního indukčního média MN6

Příloha P II: Složení regeneračního média

PŘÍLOHA P I: SLOŽENÍ ZÁKLADNÍHO INDUKČNÍHO MÉDIA MN6

Prašníky založení – indukční médium (pH = 5,8)				
MN6	mg/l	Zásobní roztok	ředění	na 1l media
KNO ₃	2 830	28,3 g	} Do 1000 ml =>	100 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	4,63 g		
KH ₂ PO ₄	400	4,00 g		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166	1,66 g		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	1,85 g		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4,4	44 mg	}	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,5	15 mg		
H ₃ BO ₃	1,6	16 mg		
KI	0,8	8 mg		
CuSO ₄	10pM	25 mg		
FeEDTA	42,1	Jako MS		5 ml/l
Nicotinic acid	2	20 mg	} Do 100 ml baňky =>	10ml/l
Pyridoxine	2	20 mg		
Thiamine HCl	2	20 mg		
Glycin	3	15 mg	Do 50 ml baňky =>	10 ml/l
Glutamin	146	730 mg	Do 50 ml baňky =>	10 ml/l
Cusamino acid	550		Vážen přímo	
Biotin	2	5 mg	Do 50 ml baňky =>	20 ml/l
Inositol	80	800 mg	Do 100 ml baňky =>	10 ml/l
2, 4-D	2,0	10 mg do 100 ml		20 ml/l
NAA	0,5	10 mg do 100 ml		5 ml/l
KI	0,5	10 mg do 100 ml		5 ml/l
+ zvýšení CuSO ₄				
maltóza	80 g/l			80 g
Gerlit	3 g/l			2,5 g
Tekuté - ficol	100g/l			100 g

Zdroj: Vlastní zpracování.

PŘÍLOHA P II: SLOŽENÍ REGENERAČNÍHO MÉDIA

Regenerační médium - PR1 , PR2 , PR3 pšenice,ječmen					
Chemikálie	Mg/l	Zásobní roztok 1000ml			Do 11 média
KNO ₃	1000 mg	10,0 g			
(NH ₄) ₂ SO ₄	200	2,0 g			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100	1,0 g	A(makro)		
KH ₂ PO ₄	300	3,0 g			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	2,0 g			
KCl	40	0,4 g			100 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O		25 mg			
MnSO ₄ ·H ₂ O	6,0	60,6 mg			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3,0	30 mg			
H ₃ BO ₃	3,0	30 mg	B(mikro)		
KI	0,5	5 mg	*		
Vitamíny					
Nikotinic acid	0,5	5 mg		Rozpustit ve 100 ml baňce	
Thiamin	1,0	10 mg			10 ml
Pyridoxine HCl	0,5	5 mg			
Glycine	2,0	20 mg		Rozpustit ve 100 ml baňce	10 ml
Inositol	100,0	1000 mg		Vážit přímo	
Fe EDTA					5 ml
PR ₁					
Maltóza	50 000	50g			
NAA	0,5 mg	10 mg		Rozpustit ve 100 ml baňce	5 ml
KI	0,5mg	10 mg			
PR ₂					
Sacharóza	30 000	30 g			
NAA	0,5 mg				
KI	1,5 mg				
PR ₃					
N ₆					
BAP	0,5mg				
Gelrite(Phytigel)	3500	3,5 g	4,0 g		
pH = 5,8	Poznámka: přidat CuSO ₄ (1,25mg/1l).				

Zdroj: Vlastní zpracování.