

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Bc. Kateřina Navrátilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizace genetických materiálů ječmene setého
pro studium pohlavím ovlivněného vývoje semen**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Navrátilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Anna Nowicka, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina NAVRÁTILOVÁ**
Osobní číslo: **R210603**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Charakterizace genetických materiálů ječmene setého pro studium pohlavím ovlivněného vývoje semen**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma genomové stability polyploidu a pohlavím ovlivněného vývoje semen.
2. Optimalizace in vitro protokolu tvorby tetraploidního ječmene (ošetření kolchicinem diploidního ječmene).
3. Charakteristika rostlin tetraploidního ječmene (fenotyp celé rostliny, životaschopnost pylu, vývoj osiva).
4. Porovnání exprese genu fotoperiodické dráhy u diploidních a tetraploidních rostlin (RT-qPCR).
5. Křížení a studium fenotypu vývoje F1 diploidních x tetraploidních hybridních semen.
6. Studium anatomie hybridních semen pomocí mikrotomových řezů.
7. Zvládnutí práce se světelným, fluorescenčním a semi-konfokálním mikroskopem.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Tomaszewska P., Kosina R. (2018) Instability of endosperm development in amphiploids and their parental species in the genus *Avena* L. *Plant Cell Reports*, 37:1145–1158, doi: 10.1007/s00299-018-2301-x.
2. Baroux C., Pecinka A., Fuchs J., Schubert I., Grossniklaus U. (2007) The triploid endosperm genome of *Arabidopsis* adopts a peculiar parental-dosage-dependent chromatin organization. *Plant Cell*, 19: 1782–1794, doi: 10.1105/tpc.106.046235.
3. Yang, F., Fernández-Jiménez N., Majka J., Pradillo M., Pecinka A. (2021) Structural maintenance of chromosomes 5/6 Complex is necessary for tetraploid genome stability in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2021.748252. 2021. In press.
4. Doyle J.J., Coate J.E. (2019) Polyploidy, the nucleotype and novelty: the impact of genome doubling on biology of the cell. *International Journal Plant Sciences*, 180(1):1–52. 2019, doi: 0.1086/700636
5. Waters A.J., Makarevitch I., Eichten S.R., Swanson-Wagner R. A., Yeh C. T., Xu W., Schnable P.S., Vaughn M.W., Gehring M., Springer N.M. (2011) Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *Plant Cell*, 23: 4221–4233, doi: 10.1105/tpc.111.092668.
6. Sourour A., Ameni B., Mejda Ch. (2014) Efficient production of tetraploid barley (*Hordeum vulgare* L.) by colchicine treatment of diploid barley. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2(1S): 2320-8694.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Anna Nowicka, PhD.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 27. října 2021
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 17. března 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Kateřina Navrátilová

Název práce: Charakterizace genetických materiálů ječmene setého pro studium pohlavím ovlivněného vývoje semen

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Anna Nowicka, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Klíčová slova: diploidní a tetraploidní ječmen, interploidní křížení, parentální konflikt, triploidní blok

Počet stran: 63

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Souhrn: Zrna obilnin představují specifický typ semen, kde většinu tvoří triploidní pletivo vyživující embryo tzv. endosperm. Endosperm vzniká díky dvojitému oplození kombinací rodičovských genomů v unikátním poměru, a to dvou mateřských a jedné otcovské kopie (2m:1p) a tento poměr je zásadní pro správný vývoj semene. Ke změně tohoto poměru může docházet křížením parentálních linií s různou ploidií, která mají za následek vznik tzv. parentálního konfliktu. Pro studium vlivu parentálního konfliktu na vývoj semen u ječmene bylo prováděno konkrétně na divokém ječmenu (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*). Jelikož ječmen je diploidní druh, jako první jsme vytvořili a charakterizovali autotetraploidní linie ječmene. Následně byly diploidní a tetraploidní rostliny použity pro interploidní křížení. Oba směry křížení vedly k tvorbě malých a lehkých semen. Křížení diploidní matky s tetraploidním otcem vedlo k opožděné celularizaci, což vedlo k tvorbě velmi malého množství endospermu. Zatímco křížení tetraploidní matky s diploidním otcem vedlo k brzké celularizaci, kdy v tomto případě endosperm vyplnil celý prostor semene. Tyto poznatky poukazují na vznik triploidního bloku a nabízí nám tak lepší pochopení molekulárních mechanismů rodičovského konfliktu a genomického imprintingu u obilnin.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Navrátilová

Title: Characterization of barley genetic materials to study the parental-dosage-dependent seed development

Type of thesis: Masters

Department: Department of Cell Biology and Genetics, FS UP in Olomouc

Supervisor: Mgr. Anna Nowicka, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Keywords: diploid and tetraploid barley, interploidy crosses, parental conflict, triploid block

Number of pages: 63

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary: Cereal grains represent a specific type of seed, where the majority consists of the triploid tissue that nourishes the embryo, known as the endosperm. The endosperm is the second product of double fertilization and contains an unusual combination of parental genomes with two maternal and one paternal copy (2m:1p). This ratio is essential for the proper endosperm and seed development. A change in this ratio can occur by crossing plants with different ploidies, resulting in the emergence of a so-called parental conflict. To study the effect of parental conflict on barley seed development was carried out on wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*). However, since barley is a diploid species, we first created and characterized autotetraploid barley lines. Then diploid and tetraploid lines were used for interploidy crosses. Both directions of the crosses revealed defect in hybrid seed development. Crossing a diploid mother with a tetraploid father resulted in delayed cellularization, and dry seeds contained very small amount of endosperm. While crossing a tetraploid mother with a diploid father resulted in early cellularization and presence of endosperm in whole space of seed. These findings point to the emergence of a triploid block and offer us a better understanding of the molecular mechanisms of parental conflict and genomic imprinting in cereals.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, za použití uvedených literárních zdrojů a pod vedením Mgr. Anny Nowicky, Ph.D.

V Olomouci dne:

.....

Bc. Navrátilová Kateřina

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Anně Nowicce Ph.D. za její věnovaný čas, ochotu, trpělivost a za odborné vedení při zpracování literární rešerše a vedení laboratorní práce. Chtěla bych také poděkovat celému vědeckému týmu doc. Mgr. Aleše Pečínky Ph.D. za ochotu a příjemnou atmosféru v laboratoři. A na závěr bych chtěla poděkovat také paní Zdeňce Dubské za pomoc při přípravě mitotických chromozomů.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Taxonomie a morfologie ječmene.....	3
3.1.1	Reprodukční morfologie ječmene.....	3
3.1.2	Stavba a vývoj semene.....	4
3.1.3	Stavba a vývoj embrya.....	5
3.1.4	Stavba a vývoj endospermu.....	6
3.1.5	Vývoj osemení a jeho funkce.....	8
3.2	Polyloidie.....	8
3.2.1	Polyploidizace celogenomovou multiplikací.....	9
3.2.2	Umělá tetraploidizace/polyploidizace ječmene.....	10
3.3	Parentální konflikt a jeho původ.....	11
3.3.1	Interploidní křížení a triploidní blok.....	12
4	Materiál a metody.....	14
4.1	Biologický materiál.....	14
4.2	Chemikálie.....	14
4.3	Soupravy.....	16
4.4	Roztoky a jejich příprava.....	16
4.5	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	19
4.6	Software.....	20
4.7	Metodika.....	21
4.7.1	Tvorba tetraploidního ječmene.....	21
4.7.1.1	Výsev a podmínky růstu rostlin.....	21
4.7.1.2	Sterilizace semen.....	22
4.7.1.3	Preparace embrya a <i>in vitro</i> podmínky růstu rostlin.....	22
4.7.1.4	Ošetření kolchicinem.....	22
4.7.1.5	Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie.....	23
4.7.2	Charakterizace a selekce stabilních tetraploidních linií.....	24
4.7.2.1	Vegetativní fáze růstu rostlin.....	24
4.7.2.2	Hustota a tvar stomatálních znaků.....	24
4.7.2.3	Porovnání exprese vybraných genů kvetení u diploidních a tetraploidních rostlin... ..	25
4.7.2.3.1	Izolace RNA.....	25
4.7.2.3.2	Reverzní transkripce.....	25
4.7.2.3.3	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí.....	25
4.7.2.4	Reprodukční fáze růstu rostlin.....	27

4.7.2.4.1	Fenotypová analýza rostlin.....	27
4.7.2.4.2	Kontrola životaschopnosti a velikosti pylu	27
4.7.2.4.3	Fenotypová analýza suchých klasů	27
4.7.2.4.4	Charakterizace semen tetraploidních a diploidních linií	27
4.7.2.4.5	Test klíčení semen generace C2 a C3.....	28
4.7.2.5	Kontrola stability tetraploidních linií pomocí fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	28
4.7.2.5.1	Příprava mitotických chromozomů	28
4.7.2.5.2	Fixace kořenů ječmene.....	28
4.7.2.5.3	Příprava sklíčků	28
4.7.2.5.4	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	29
4.7.3	Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen.....	30
4.7.3.1	Interploidní křížení	30
4.7.3.2	Hodnocení fenotypů semen	31
4.7.3.3	Test životaschopnosti buněk barvením tetrazoliem.....	31
4.7.3.4	Test buněčné smrti barvením Evansovou modří	31
4.7.3.5	Histologická analýza	31
4.7.3.5.1	Fixace semen	31
4.7.3.5.2	Tvorba řezů pomocí mikrotomu.....	32
4.7.3.5.3	Barvení řezů provedených mikrotomem	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Tvorba tetraploidního ječmene.....	34
5.1.1	Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie.....	35
5.2	Charakterizace a selekce stabilních tetraploidních linií	36
5.2.1	Vegetativní fáze růstu.....	36
5.2.1.1	Hustota a tvar stomatálních znaků.....	37
5.2.1.2	Porovnání exprese vybraných genů kvetení u diploidních a tetraploidních rostlin... 38	38
5.2.2	Reproduktivní fáze růstu	39
5.2.2.1	Fenotypová analýza vzrostlých rostlin	39
5.2.2.2	Kontrola životaschopnosti a velikosti pylu	40
5.2.2.3	Fenotypová analýza suchých klasů.....	41
5.2.2.4	Charakterizace semen tetraploidních a diploidních linií	42
5.2.2.5	Analýza počtu chromozomů.....	43
5.3	Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen.....	44
5.3.1	Test životaschopnosti buněk barvením tetrazoliem.....	45
5.3.2	Test buněčné smrti barvením Evansovou modří	46
5.3.3	Histologická analýza	47
6	Diskuse	49

6.1	Tvorba tetraploidního ječmene.....	49
6.2	Charakterizace a selekce stabilní tetraploidní linie	50
6.3	Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen.....	52
7	Závěr.....	55
8	Seznam použité literatury	56
8.1	Internetové zdroje.....	63

Seznam symbolů a zkratk

2x	diploidní
2x × 4x	diploidní matka křížená s tetraploidním otcem
4x	tetraploidní
4x × 2x	tetraploidní matka křížená s diploidním otcem
cDNA	komplementární DNA
DAP	den po opylení (day after pollination)
DOP	den opylení (day of pollination)
EAS	brzy abortované semeno (early-aborted seed)
EtOH	ethanol
HS	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> (divoký ječmen)
<i>HvAKT</i>	<i>AKTIN</i>
<i>HvFT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
<i>HvPPD</i>	<i>PHOTOPERIOD 1</i>
HTS	hmotnost tisíce semen
<i>HvVRN1</i>	<i>VERNALIZATION 1</i>
KCl	chlorid draselný
LAS	pozdě abortované semeno (late-aborted seed)
MS	Murashige a Skoog médium
NaClO	chlornan sodný
NS	normální semeno
RT-qPCR	kvantitativní PCR s reverzní transkripcí
WGM	celogenomová multiplikace (whole genome multiplication)

Seznam obrázků

Obrázek 1: Stavba klásku ječmene	4
Obrázek 2: Fenotyp vyvíjejících se semen ječmene kultivaru Compana	5
Obrázek 3: Popis embrya u podélného řezu semene ječmene starého 16 DAP	6
Obrázek 4: Schéma podélného řezu semenem a jednotlivých typů buněk v endospermu.....	6
Obrázek 5: Schématické znázornění <i>in vitro</i> indukce polyploidizace	10
Obrázek 6: Schématické znázornění následku křížení stejných ploidii a interploidního křížení.....	13
Obrázek 7: Schématické znázornění ošetření diploidních sazenic kolchicinem.....	21
Obrázek 8: Příprava sazenic pro ošetření kolchicinem (kultivar Morex)	22
Obrázek 9: Schématické znázornění jednotlivých generací nově vytvořené tetraploidní linie	23
Obrázek 10: Experimentální návrh charakterizace a selekce tetraploidních linií	24
Obrázek 11: Schématické znázornění ořezu semene (16 DAP) pro jeho fixaci	32
Obrázek 12: Poměr přežití rostlin C1 generace pěstovaných v půdě a <i>in vitro</i> podmínkách po jejich vystavení kolchicinu.....	34
Obrázek 13: Účinnost tetraploidizace C1 generace u tří genotypů ječmene.	36
Obrázek 14: Schopnost klíčení tetraploidních semen C2 generace u tří genotypů ječmene.....	37
Obrázek 15: Charakterizace stomatálních znaků u diploidních a tetraploidních (C2 generace) rostlin ječmene.....	38
Obrázek 16: Relativní exprese u diploidního a tetraploidního ječmene kultivaru Morex.	39
Obrázek 17: Fenotypová analýza diploidního a tetraploidního ječmene v reprodukční fázi růstu ...	40
Obrázek 18: Životaschopnost pylu u diploidního a tetraploidního (C2 generace)	41
Obrázek 19: Charakterizace klasu a semen diploidního a tetraploidního ječmene.....	42
Obrázek 20: Charakterizace diploidních a tetraploidních (C3 generace) semen u ječmene	43
Obrázek 21: Potvrzení počtu chromozomů u diploidního a tetraploidního (C3 generace) divokého ječmene na metafázových chromozomech kořenového apikálního meristému	44
Obrázek 22: Fenotypové defekty semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene.....	45
Obrázek 23: Testování životaschopnosti a schopnosti klíčit semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene.	46
Obrázek 24: Přítomnost endospermu v semenech získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene.....	47
Obrázek 25: Mikrotomové řezy 16 DAP semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene.....	48

Seznam tabulek

Tabulka 1: Reakční směs pro RT-qPCR.....	26
Tabulka 2: Nastavení teplotního programu pro RT-qPCR.	26
Tabulka 3: Seznam použitých genů a primerů pro RT-qPCR.	26
Tabulka 4: Příprava hybridizačního mixu pro fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci	29

1 Úvod

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) je diploidní rostlina ($2x$), která má 14 chromozomů, stejně tak jeho progenitor divoký ječmen (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*; IBGSC, 2012). Semena ječmene setého se tvoří během tzv. dvojitého oplození, kdy je zárodečný vak oplozen dvěma spermatickými buňkami. Jedna splývá s vaječnou buňkou za vzniku diploidního embrya a druhá splývá s dvěma jádry zárodečného vaku, kdy vzniká triploidní pletivo tzv. endosperm, který zajišťuje výživu embrya. Endosperm tak obsahuje dvě kopie mateřského genomu a jednu otcovského ($2m:1p$) a tento poměr je zásadní pro správný vývoj semene. K narušení tohoto poměru může docházet mezidruhovým, či interploidním křížením, které mohou vést ke vzniku tzv. paternálního konfliktu. Parentální konflikt předpokládá, že zájmy matky a otce jsou v rozporu, kdy otec usiluje o maximální vývoj potomků, zatímco zájmem matky je stejný vývin všech potomků (Pires, 2014; Kinoshita, 2018).

V této diplomové práci jsme se proto zaměřili na studium vlivu parentálního konfliktu na vývoj semen vzniklých interploidním křížením u ječmene. Abychom toto mohli sledovat u ječmene, prvním krokem bylo vytvořit tetraploidní linie, poté tyto linie charakterizovat a vybrat stabilní linii pro finální krok, kterým bylo samotné interploidní křížení.

2 Cíle práce

Pro vypracování diplomové práce byly stanovené následující cíle práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma genomové stability polyploidu a pohlavím ovlivněného vývoje semen.
2. Optimalizace *in vitro* protokolu tvorby tetraploidního ječmene (ošetření kolchicinem diploidního ječmene).
3. Charakteristika rostlin tetraploidního ječmene (vegetativní a reprodukční fáze růstu rostlin).
4. Porovnání exprese vybraných genů kvetení u diploidních a tetraploidních rostlin (RT-qPCR).
5. Křížení a studium fenotypu vývoje F1 interploidních semen.
6. Studium anatomie hybridních semen pomocí mikrotomových řezů.
7. Zvládnutí práce se světelným, fluorescenčním a semi-konfokálním mikroskopem.

3 Literární přehled

3.1 Taxonomie a morfologie ječmene

Ječmen setý (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*; $2n = 2x = 14$; 5,1 Gbp/1C) je jednoletá obilovina řadící se do krytosemenných jednoděložných rostlin spadajících pod čeleď *Poaceae* (lipnicovitých) a rod *Hordeum*. Tento rod pojímá celkově 32 druhů se základním počtem chromozomů $x = 7$, včetně diploidních, tetraploidních a hexaploidních druhů. Zatímco ječmen setý jako jediný kultivovaný zástupce tohoto rodu a jeho progenitor *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (dále nazývaný jako divoký ječmen) jsou diploidní druhy s počtem chromozomů $2n = 2x = 14$ (IBGSC, 2012; Blattner, 2018).

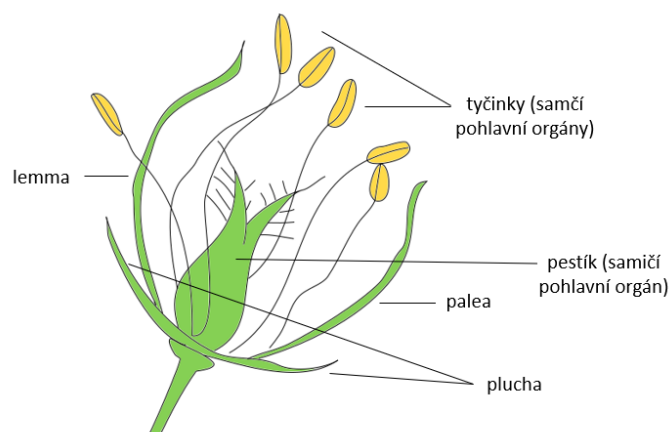
Kultivovaný ječmen je čtvrtou obilninou v celosvětové produkci a pěstuje se zhruba ve 100 zemích celosvětově (Bartlett et al., 2008; Langridge, 2018). Jeho semena jsou využívána jako krmivo pro zvířata (70 %), k produkci alkoholických nápojů (21 %), ale také jako zdroj potravy (6 %). K tomu v dnešní době dochází ke zvyšování zájmu o využití ječmene pro výrobu biopaliv, kosmetiku a molekulární zemědělství (Hicks et al., 2014; Holásková et al., 2018; Langridge, 2018; Nowicka et al., 2021).

Divoký ječmen je pro ječmen setý bohatým zdrojem genů rezistentních, jak k abiotickým stresům jako jsou sucho (Wang et al., 2018), salinita (Yan et al., 2008), chlad (Chen et al., 2008), či teplo (Bahrami et al., 2019), tak k biotickým stresům jako jsou například plísňe (Fetch et al., 2003). Což jsou žádoucí vlastnosti, které jsou nadějí pro zlepšení obilovin.

Co se týče morfologie ječmene, tato rostlina je tvořena dlouhým dutým stonkem, který nazýváme stéblo, její květenství se nazývá klas a plod obilka. Stébla jsou vzpřímená a skládají se z dutých internodií oddělených uzly nesoucích listy. Listy ječmene jsou čárkovité a tvoří se na opačných stranách stonku (AGO, GTR, 2021).

3.1.1 Reprodukční morfologie ječmene

Rostlina zralého ječmene se skládá z centrálního stonku a 2–5 větvených stonků nazývaných odnože. Vrchol centrálního stonku a každá fertlní odnož nese klas. Klas je poté tvořen jednotlivými klásky a každý klásek nese jeden kvítek. Klásek se poté skládá ze dvou pluch, což jsou prázdné listeny a uvnitř se nachází kvítek, který je tvořen dvěma listeny lemma a palea, které uzavírají reprodukční orgány (Obrázek 1; AGO, GTR, 2021). Jednotlivé klásky mohou být uspořádány na klasech do dvou či šesti řad (Komatsuda et al., 2007).



Obrázek 1: Stavba klásku ječmene (inspirováno AGO, GTR, 2021).

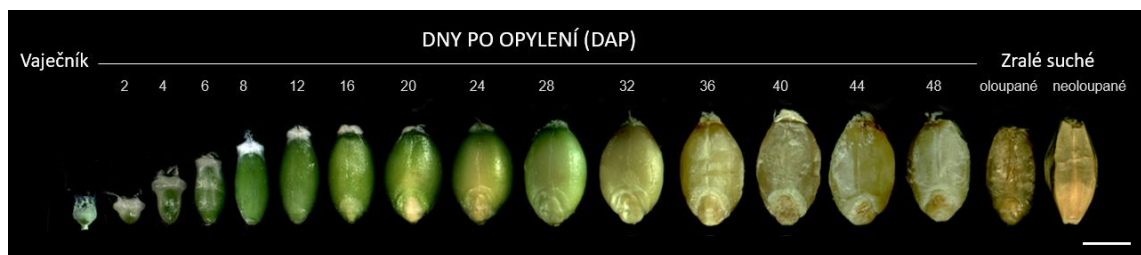
Ječmen lze rozdělit na zimní a jarní typ. Odrůdy zimního ječmene pro zahájení kvetení potřebují období chladu (vernalizace), zatímco odrůdy jarního ječmene vernalizaci nepotřebují. Zimní odrůdy navíc produkují více odnoží oproti jarním odrůdám (AGO, GTR, 2021).

Kultivovaný ječmen a jeho progenitor divoký ječmen se rozmnožují výhradně samoopylením (~99 %) a genový tok v ječmeni je tak velmi nízký (AGO, GTR, 2021).

3.1.2 Stavba a vývoj semene

Semeno je důležitým orgánem, díky kterému je rostlina schopna se pohlavně rozmnožovat. Skládá se ze tří důležitých částí. První z nich je embryo, které nese samostatnou genetickou informaci pro další generaci. Druhou důležitou součástí semene je endosperm, který slouží jako zásobárna živin pro embryo a podporuje tak embryogenezi a je tedy z velké části spotřebován vyvíjejícím se embryem nebo po vyklíčení sazenice (Lopes a Larkins, 1993). U ječmene v suchých semenech endosperm zabírá 80 % z celého semene (Nowicka et al., 2021). Poslední část semene tvoří tzv. osemení, které slouží jako ochranné pouzdro celého semene při dormanci, či klíčení (Dante et al., 2014).

Růst a vývoj semene, od oplodnění až po zralé semeno, můžeme rozdělit do tří fází. Fáze I (0–6 dní po opylení – ang. day after pollination – DAP) začíná dvojitým oplozením a pokračuje následnou proliferací. Fáze II (7–20 DAP) je typická diferenciací buněk a akumulací zásobních látek. A konečná fáze, fáze III (21 DAP a dál) je charakteristická úbytkem hmotnosti z důvodu vysychání semene a dormance (Obrázek 2; Rodríguez et al., 2015, Nowicka et al., 2021).



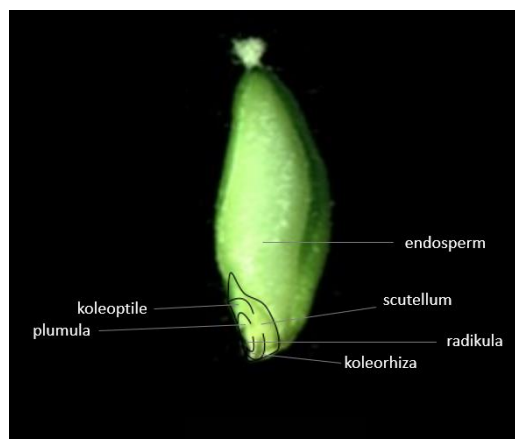
Obrázek 2: Fenotyp vyvíjejících se semen ječmene kultivaru Compana (převzato a upraveno z Nowicka et al., 2021). Měřítka odpovídá 5 mm.

Vývoj semene u ječmene je stejně jako u jiných krytosemenných rostlin iniciován dvojitým oplozením. Jedná se o proces, při kterém dochází ke splynutí jedné spermatické buňky s vaječnou buňkou za vzniku diploidního embrya ($2x$ – obsahuje jednu kopii genomu od každého rodiče, $1m:1p$), zatímco druhá spermatická buňka splývá se dvěma jádry centrální buňky a vzniká tak triploidní endosperm ($3x$ – obsahuje dvě kopie samičího genomu a jednu kopii samčího genomu, $2m:1p$). Celý tento proces se odehrává v zárodečném vaku (samičí gametofyt), který se nachází uvnitř vajíčka. Samčí gametofyty oproti tomu vznikají v prašníku ve formě pylových zrn, kde každé zrno obsahuje jednu vegetativní a dvě generativní buňky jinými slovy dvě spermatické buňky. Po opylení se tak z vajíčka stává semeno (Lopes a Larkins, 1993).

Semena ječmene stejně jako semena jiných obilovin jako jsou například pšenice, rýže, kukuřice, oves a žito jsou zdrojem bohatým na vitamíny, minerály, sacharidy, tuky a bílkoviny. Jsou tak využívány pro tvorbu potravin jako jsou těstoviny, chléb, mouka, či alkoholické nápoje, ale také slouží pro výrobu krmiva pro zvířata (Sarwar et al., 2013). Semena obilovin také obsahují pro zdraví člověka důležitou rozpustnou vlákninu. Bylo prokázáno, že tato vláknina snižuje riziko rakoviny tlustého střeva a konečníku (Bingham et al., 2003), obezity (Liu et al., 2003), divertikulární choroby (Aldoori et al., 1998), cukrovky druhého typu a kardiovaskulárních onemocnění (Jacobs a Gallaher 2004).

3.1.3 Stavba a vývoj embrya

Strukturu embrya můžeme rozdělit do tří hlavních částí. První z nich je embryonální kořen (radikula), který je obklopený kořenovou pochvou (koleorhiza). Dále se dělí na výhonkový apikální meristém (plumula), který dává základ epikotylu a je chráněn pupenovou pochvou (koleoptile) a na štítek (scutellum – modifikovaný cotyledon; Obrázek 3). V embryu u jednoděložných rostlin se nachází pouze jeden klíční list (cotyledon; Rodríguez et al., 2015).

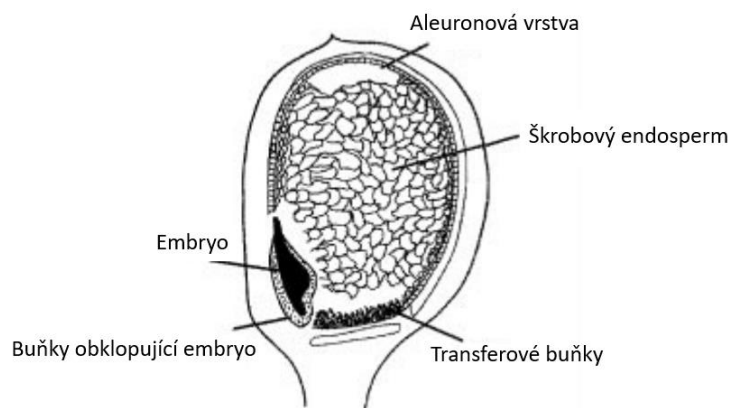


Obrázek 3: Popis embrya u podélného řezu semene ječmene starého 16 DAP (inspirováno Rodríguez et al., 2015).

Vývoj embrya neboli embryogeneze je proces, který je zahájen oplozením vaječné buňky spermatickou buňkou za vzniku zygoty. Zygota se pak následně asymetricky dělí a vytváří tak apikální a bazální buňku. U mnoho rostlin je proembryo tvořeno pouze proliferací apikální buňky, nicméně například u lipnicovitých se apikální a bazální buňky podílejí stejnou mírou na tvorbě embryonálních struktur. Apikální buňka dává základ klíčnímu listu a horní části stonku (epikotyl), zatímco bazální buňka dává základ tvorbě radikuly a hypokotylu. Pozdější fáze vývoje embrya zahrnují různé fyziologické změny, které umožňují embryu tolerovat vysušení nebo také navodit dormanci a zamezit tak klíčení po určitou dobu (Dante, 2014; Sabelli, 2012).

3.1.4 Stavba a vývoj endospermu

Endosperm je zásobní orgán, který vzniká díky dvojitému oplození. Plně vyvinutý endosperm se skládá ze čtyř hlavních typů buněk. Škrobového endospermu, aleuronové vrstvy, transferových buněk a buněk obklopujících embryo (Obrázek 4; Olsen, 2001).



Obrázek 4: Schéma podélného řezu semenem a jednotlivých typů buněk v endospermu (převzato a upraveno z Olsen, 2001).

Aby mohlo dojít ke vzniku těchto jednotlivých buněk, musí endosperm projít několika fázemi vývoje. První dvě fáze jsou tvorba syncytia a celularizace. Poté následuje diferenciaci, která zahrnuje mitózu, endoreduplikaci a akumulaci zásobních sloučenin. Finální fází je pak samotné zrání (Sabelli a Larkins, 2009).

Právě po dvojitém oplození nastává fáze tvorby syncytia. Jedná se o fázi, kdy vzniklé triploidní embryo prochází řadou synchronizovaného dělení při absenci buněčné stěny a cytokineze, čímž dochází k vzniku syncytia obsahujícího mnoho jader, obklopující velkou centrální vakuolu (Olsen, 2001). Tato fáze trvá obvykle až 5 DAP, podle závislosti na daném druhu (Sabelli a Larkins, 2009). Fáze celularizace je zahájena vznikem radiálního mikrotubulárního systému, který se tvoří z obalů jednotlivých jader syncytia a dochází tak k vzniku trubcovitých struktur, které nazýváme alveoly. Důsledkem mitotického dělení jader v alveolech, cytokineze a následnou tvorbou buněčné stěny dochází ke vzniku nové periferní vrstvy buněk a nové vrstvy alveol směrem k centrální vakuole. Cyklickým opakováním stejných událostí, tak dochází k postupnému potlačení centrální vakuoly až do jejího samotného zániku a tím kompletace celularizace (Olsen, 2001). Tento proces je obvykle u obilnin dokončen během 8 DAP (Sabelli a Larkins, 2009).

Dále nastává fáze diferenciaci, kdy dochází ke vzniku čtyř hlavních typů buněk zmíněných výše. Některé vrstvy endospermu v blízkosti placenty se začínají diferencovat dříve, dokonce již před ukončením samotné celularizace, a to na transferové buňky. Tyto buňky mají zvětšený povrch cytoplazmatické membrány pro snazší absorpci živin a jejich následný přenos do endospermu (Olsen, 2001; Sabelli a Larkins, 2009).

Aleuronové buňky pokrývají celý obvod endospermu, kromě oblasti transferových buněk. U některých druhů mohou tvořit jednu až dvě vrstvy, výjimkou je ječmen, který obsahuje vrstvy tři. Aleuronové buňky obsahují hustou zrnitou cytoplazmu, díky přítomnosti malých vakuol s inkluzními tělísky, které nazýváme aleuronová zrna. Díky speciálnímu vývojovému programu jsou aleuronové buňky tolerantní k vysychání a jsou tak schopny přežít proces zrání (Olsen, 2001).

Jednu z nejdůležitějších částí endospermu tvoří škrobový endosperm. Škrobový endosperm představuje největší část buněčné hmoty v endospermu, která se u ječmene skládá z 80 000–90 000 buněk (Olsen, 2001). Jedná se o důležitý zdroj škrobu, jehož tvorbu zabezpečují čtyři enzymy: ADP-glukózo-pyrofosforyláza, škrobová syntáza, odvětovací a větvicí enzym (James et al., 2003). Další důležitou součástí škrobového endospermu jsou zásobní proteiny prolaminu a globuliny, ale může docházet k hromadění i jiných minoritních proteinů. Jak prolaminu, tak i globuliny tvoří nerozpustná proteinová tělíska v lumenu drsného endoplazmatického retikula, k jejichž hromadění dochází zejména v pozdní fázi vývoje endospermu. Po celularizaci a diferenciaci buňky škrobového endospermu podstupují endoreduplikaci (vysvětleno později) a poté proces podobný programované buněčné smrti u živočišných buněk (Olsen, 2001, Sabelli a Larkins, 2009).

Posledním typem buněk, které vznikají diferenciací, jsou buňky obklopující embryo. Tyto buňky se skládají z několika vrstev a obklopují tak celé embryo v jeho rané fázi. S růstem embrya pak dochází k redukci těchto buněk a okolo 12 DAP můžeme pozorovat pouze jejich pozůstatky v těsné blízkosti embrya (Sabelli a Larkins, 2009). Konkrétní funkce těchto buněk není zcela prozkoumaná, ale předpokládá se, že se podílejí na zásobování embrya cukry nebo také že představují fyzickou bariéru mezi embryem a endospermem a poskytují tak prostor pro komunikaci mezi těmito dvěma strukturami (Olsen, 2004; Sabelli a Larkins, 2009).

3.1.5 Vývoj osemení a jeho funkce

Osemení je ochranná struktura mateřského původu, která se vyvíjí z integumentů obalujících vajíčko. U lipnicovitých je osemení navíc srostlé s oplodím, které také jinak nazýváme perikarp (Sabelli, 2012). Z botanického hlediska, kvůli přítomnosti perikarpu, je ječné zrno jednoosemenným ovocem (Rodríguez et al., 2015). Jeho růst a diferenciací je zahájena fertilizací a prochází fázemi buněčného dělení, elongací buněk, samotnou diferenciací a programovanou buněčnou smrtí, která je koordinována s vývojem embrya a endospermu (Haughn a Chaudhury, 2005). Před oplozením vajíčka jsou buňky relativně nediferencované, nicméně po oplození dochází k jejich značné diferenciaci na specializované typy buněk, nebo může dokonce docházet k akumulaci pigmentů, které napomáhají utvářet celkovou morfologii semene (Moïse et al., 2005).

Osemení poskytuje mechanickou bariéru, která chrání embryo a endosperm a zároveň zajišťuje výměnu plynů a tekutin s okolním prostředím. Jeho hlavní funkcí je ochrana semene při dormanci, kdy osemení brání vývoji embrya v semenáček, či rostlinku a umožňuje tak potomstvu přežití za nepříznivých vnějších podmínek. Osemení hraje také důležitou roli během klíčení semene, kdy musí dojít k jeho oslabení a rozlomení, čímž může poskytnout složky, které přispívají k odolnosti vůči biotickým a abiotickým stresům (Moïse et al., 2005).

3.2 Polyloidie

Ploidii lze charakterizovat jako počet kopií genomu obsažených v jednom samostatném jádře. Diploidní buněčné jádro tak obsahuje dvě kopie genomu, zatímco buněčné jádro, které obsahuje více jak dvě kopie genomu, například 3, 4 nebo 8, nazýváme jako polyploidní (Robinson et al., 2018).

K označení ploidie se pak používají dva základní termíny, a to hodnota „n“ a hodnota „C“. Hodnota „n“ nám udává počet samostatných chromozomů v buňce (Edgar a Orr-Weaver, 2001), zatímco hodnota „C“ stanovuje obsah DNA v jedné haploidní sadě chromozomů před samotnou replikací DNA (Doležel a Bartoš, 2005).

Při změně, tedy zvýšení, či snížení ploidie dochází ke změně, jak objemu chromatinu v jádře, tak i ke změně počtu kopií každého genu. S těmito změnami jsou spojeny účinky, které zahrnují změny v genové expresi, velikosti jádra, velikosti buněk a celkově velikosti organismu (Robinson et al., 2018).

V rostlinné říši je zvyšování ploidie tzv. polyploidizace běžná a u některých rostlinných linií je spojována se zvýšenou genetickou rozmanitostí (Comai, 2005). Polyploidizace je také důležitým mechanismem pro evoluci rostlin. Téměř 70 % krytosemenných rostlin si prošlo během svého vývoje polyploidizací (Zhang et al., 2014).

U rostlin může docházet ke změně ploidie dvěma způsoby. Prvním mechanismem je znásobení celého genomu (zkratka WGM – z anglického názvu whole-genome multiplication), který bude detailně popsán v následující podkapitole. Druhým způsobem je endoreduplikace (Robinson et al, 2018). Tato změna nastává v jednotlivých buňkách během diferenciaci. Endoreduplikace je navozena prostřednictvím tzv. endocyklu, který je alternativou k buněčnému mitotickému cyklu. Klasický buněčný cyklus zahrnuje zdvojení obsahu DNA a následné rozdělení genetického materiálu jádra do dvou dceřiných buněk. V případě endoreduplikace dochází ke zmožení obsahu DNA, ale nedochází k mitóze, tedy segregaci, což vede ke vzniku chromozomů se zvýšeným počtem chromatid (Joubès a Chevalier, 2000). Endoreduplikace je tak spojena se zvětšenou velikostí buněk a je přítomna ve většině pletiv u většiny krytosemenných rostlin (Barow, 2006). U vyvíjejících se semen probíhá v embryu, endospermu, a dokonce i v osemení (Nowicka et al., 2021).

3.2.1 Polyploidizace celogenomovou multiplikací

Jak už název napovídá, tak WGM zvyšuje ploidii ve všech buňkách organismu. Tato změna je asociována se zvětšením velikosti buněk, ale také se zvětšením samotné rostliny (Robinson et al., 2018). K znásobení celého genomu může docházet buď mezidruhovým křížením, kdy prostřednictvím pohlavních buněk dochází ke splývání dvou odlišných genomů nesoucích nehomologní chromozomy. Schopnost těchto nehomologních chromozomů se párovat je poté navozena jejich duplikací. Takto vzniklé rostliny nazýváme jako allopolyploidní. Druhou možností je zdvojení chromozomů pocházejících od stejných druhů a zabránění jejich následné segregace. Takové rostliny nazýváme jako autopolyploidní (Manzoor et al., 2019).

Polyploidie může být pro výzkumné účely také navozena uměle interploidní a interspecifickou hybridizací, somatickým zdvojením kolchicinem, nebo jako vedlejší účinek regenerace a pěstování rostlin *in vitro* (Fatima et al., 2015). Pro indukci polyploidie se používají různé rostlinné orgány, či pletiva. Příkladem mohou být kořeny, semena, nebo apikální meristém (Obrázek 5; Ghani et al., 2014).

Haploidní rostliny mohou být vytvořeny hned několika způsoby. Prvním z nich je mezidruhá hybridizace mezi ječmenem setým a *Hordeum bulbosum*. Tímto způsobem vzniká hybridní zygota, kdy dojde ke ztrátě chromozomů pocházejících od *H. bulbosum* již v rané fázi vývoje a dochází tak vývoji haploidní rostliny ječmene (Gernand et al., 2006). Dalším způsobem může být využití explantátových kultur, konkrétně například mikrospor nebo prašníků, které prošli androgenézí a jsou schopny produkovat haploidní rostliny kultivací *in vitro*. Zdvojení chromozomů je pak v obou případech navozeno chemicky kolchicinem. Tento způsob šlechtění vytváří geneticky stabilní homozygotní diploidy (Chen et al., 2021).

Pro zlepšení odrůd plodin je následně využívána umělá tetraploidizace neboli vytvoření tetraploidních linií navozením zdvojení chromozomů diploidních jedinců. U ječmene byla první tetraploidizace navozena působením vysoké teploty (40–45°C) před prvním dělením zygoty (Müntzing et al., 1937). Častějším způsobem je navození tetraploidizace chemicky prostřednictvím antimitotických činidel (uvedeno výše) jako je kolchicin (Sourour et al., 2014; Sun et al., 2020).

Tetraploidní rostliny ječmene vykazovaly pomalejší růst, kratší odnože a nižší počet listů ve srovnání s kontrolními diploidními rostlinami (Sourour et al., 2014).

3.3 Parentální konflikt a jeho původ

Pojem parentální konflikt popisuje tzv. válku mezi rodiči týkající se vývoje jejich potomstva. Parentální konflikt tvrdí, že zájmy matky a otce jsou v rozporu. Zatímco otec usiluje o co největší a nejsilnější potomstvo, zájmem matky je rovnocenný vývoj všech potomků na úkor jejich velikosti (Pires, 2014; Kinoshita, 2018).

Dříve v semenných rostlinách jedinou možností pro otce, jak zvýšit úspěšnost jejich potomků bylo prostřednictvím zlepšení fitness samčího gametofytu a gamet. Rozhodování o přerozdělení výživných zdrojů pro potomky bylo pouze na matce, jelikož vývoj embrya probíhá výhradně v mateřském sporofytu. To se však změnilo s vývojem tzv. biparentální výživné tkáně neboli endospermu u krytosemenných rostlin. Evoluce takového endospermu umožnila otcům zapojení do embryogeneze a zapojení do rozhodování o přerozdělování výživných zdrojů. Právě toto zapojení otců do embryogeneze umožnilo vytvořit potencionální konflikt mezi otcem a matkou o přerozdělení výživných zdrojů pro potomky. Nicméně některé linie ranně kvetoucích rostlin brzy po evoluci biparentálního endospermu zdvojnásobily ploidiu centrální buňky zárodečného vaku, což vedlo k zdvojnásobení mateřského genomu v endospermu, což umožnilo matkám opět získat kontrolu nad embryogenezí (Dilkes a Comai, 2004; Pires, 2014).

Takovýto zárodečný vak vzniká z haploidní megasporu, která poté prochází třemi mitotickými děleními a vzniká tak 8 jader v syncytiu. Syncytium následně prochází fází celularizace a dává tak za vznik dvěma synergidám a vaječné buňce na mikropylárním konci, centrální buňce se dvěma jádry a třemi antipodami

na chalázním konci. Po oplození takového zárodečného vaku s diploidní centrální buňkou, dochází ke vzniku triploidního endospermu a zajišťuje tak, že endosperm obsahuje dvě kopie mateřského a jednu kopii otcovského genomu ($2m:1p$; Friedman a Williams, 2003).

Evolucí triploidního endospermu již nedochází prakticky k žádným zvrátům zpět k diploidním endospermům, jinými slovy nedochází k vyživování embrya pouze samičím gametofytem. Takto vzniklý endosperm s rozdílným poměrem rodičovských genomů se stal součástí embryogeneze u kvetoucích rostlin, jakou známe dnes (Friedman et al., 2012).

3.3.1 Interploidní křížení a triploidní blok

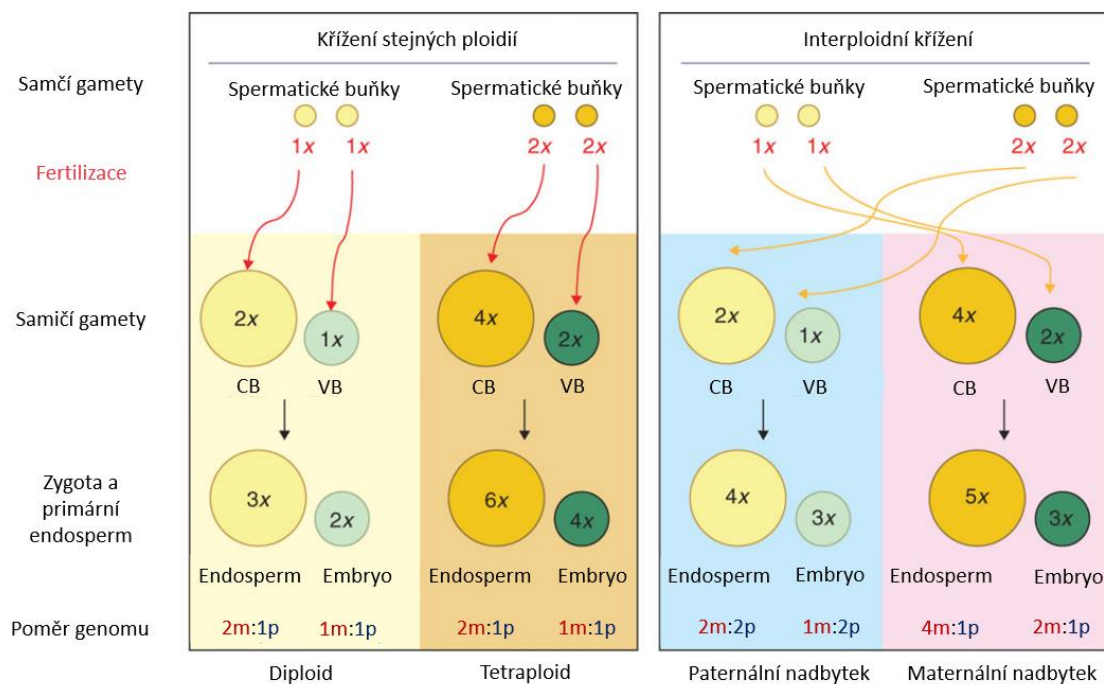
Udržování parentálního konfliktu v bilanci je zásadní pro správný vývoj semene. Nejvíce náchylnou tkání na udržení této balance je endosperm. K narušení takto nastolené rovnováhy může docházet buď prostřednictvím mezidruhových, či interploidních kříženích. Důvodem tohoto jevu je izolační bariéra, kterou nazýváme také jako triploidní blok (Brandvain a Haig, 2005).

Při křížení jedinců s různou úrovní ploidie, často dochází k poškození endospermu, což brání úspěšné hybridizaci. Zatímco při křížení dvou diploidních, či dvou tetraploidních jedinců dochází k úspěšnému vývoji. Naopak je tomu při křížení diploidního a tetraploidního jedince, kdy dochází často k abnormálnímu vývoji, či k abortu semene (Haig, 2013).

Jelikož tato reprodukční bariéra/ triploidní blok zasahuje i do křížení mezi diploidem a z něho odvozeným autotetraploidem, lze předpokládat, že zde není nijak zásadní genetický rozdíl, který by měl bránit správnému vývoji. Byla proto provedena řada studií, která se snažila tento triploidní blok vysvětlit. Nejprve byl přisuzován triploidní blok nerovnováze v poměru genomů v různých tkáních semene (Müntzing, 1930; Watkins, 1932; Valentine, 1954). Poté padla myšlenka, že selhání endospermu může být způsobeno genetickou konstitucí samotného endospermu (Wangenheim, 1957). Nicméně v roce 1971 Sarker a Coe popřeli všechny předcházející hypotézy a jako zásadní podmínku pro správný vývoj semene považovali triploidní endosperm, avšak bez jakéhokoliv odůvodnění. Až studie prováděná na kukuřici dokázala tento fenomén objasnit. Ukázalo se, že nutností pro správný vývoj semene, respektive endospermu je přítomnost dvou maternálních genomů na jeden paternální genom, tedy udržení poměru $2m:1p$ (Lin, 1984).

Křížení mezi diploidem a tetraploidem byla prováděna také u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* a různých druhů z čeledi *Brassicaceae*, například brukve zelné a kokošky pastuší tobolky. Všechny zmiňované druhy představují typ semene, kde vyvíjející se embryo spotřebovává většinu endospermu před dozráním semene. Ukázalo se, že v případě, kdy byla křížena diploidní matka s tetraploidním otcem a došlo tak ke změně poměrů v endospermu na $2m:2p$, endosperm se začal typicky nadměrně proliferovat kvůli zrychlené rychlosti mitotického dělení a opožděné celularizaci. V takovémto případě se jedná o efekt tzv. paternálního nadbytku a pokud v takovémto případě vznikají životaschopná semena,

jsou typicky větší a těžší než klasická semena. Naopak, pokud docházelo k tzv. maternálnímu nadbytku, v případě křížení tetraploidní matky s diploidním otcem, docházelo ke změně poměru v endospermu na 4m:1p (Obrázek 6). V takovéto situaci endosperm vykazoval snížené mitotické dělení a předčasnou celularizaci, což vedlo k produkci menších a lehčích semen (Scott et al., 1998; Stoute et al., 2012; Lafon-Placette et al., 2018).



Obrázek 6: Schématické znázornění následku křížení stejných ploidií a interploidního křížení (převzato a upraveno z Pennington et al., 2008). CB – centrální buňka; VB – vaječná buňka; znázorněná ploidie (1x – haploidní, 2x – diploidní, 3 – triploidní, 4x – tetraploidní, 5x – pentaploidní, 6x – hexaploidní) a rodičovský původ (m – maternální; p – paternální).

Podobné výsledky byly pozorovány také u trav (*Poaceae*), které mají obecně velký endosperm, a především obiloviny byly vyšlechtěny pro svou vysokou nutriční hodnotu. Příkladem může být kukuřice a rýže, kdy endospermy s poměrem 2m:2p vykazovaly prodlouženou proliferaci s opožděným nástupem endoreduplikace, a zároveň nebyly schopny vytvořit vrstvu transferových buněk. Naopak endospermy s poměrem 4m:1p vykazovaly sníženou mitotickou proliferaci s předčasným nástupem endoreduplikace (Leblanc et al., 2002; Pennington et al., 2008; Ishikawa et al., 2011). Což naznačuje, že maternální nadbytek způsobuje brzké umlčení genů spojených s proliferací endospermu a zároveň brzkou aktivaci genů spojených s diferenciací, zatímco paternální nadbytek má opačný efekt (Li a Dickinson, 2010).

Tyto studie prokázali, že pokud křížíme jedince s různou ploidií, dochází k eskalaci parentálního konfliktu, jelikož se mění poměr v endospermu 2m:1p a zájmy otce a matky jsou tak v rozporu. Způsoby, jakými lze udržet parentální konflikt v bilanci a zajistit tak správný vývoj semen, je buď prostřednictvím ploidie, či genomového imprintingu (Dilkes a Comai, 2004; Pires, 2014).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Kultivovaný ječmen (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*, $2n=2x=14$), jarní typ, dvouřadí elitní kultivar Compana (PI 539111)
- Kultivovaný ječmen (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*, $2n=2x=14$), jarní typ, šestiřadí elitní kultivar Morex (BCC 906)
- Divoký ječmen (*Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, $2n=2x=14$) fakultativní typ, dvouřadí (HOR 12560)

Semena kultivaru Compana byla získána z Národní sbírky malých zrn národního systému pro rostlinné germplazmy Ministerstva zemědělství a zemědělského výzkumu USA (angl. National Small Grains Collection of the National Plant Germplasm System of the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service). Semena zbývajících rostlin byla získána z Leibnizova institutu pro genetiku rostlin a výzkum rostlinných plodin (angl. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research – IPK), Gatersleben, Německo.

4.2 Chemikálie

- 2,3,5-trifenylnitroimidazolium chlorid ($C_{19}H_{15}ClN_4$; Sigma-Aldrich, kat. č. T8877)
- 37% formaldehyd (Sigma-Aldrich, kat. č. F8775)
- 37% kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, kat. č. 435570)
- 4',6-diamidino-2-fenylnitroimidazol dihydrochlorid (DAPI; Sigma-Aldrich kat. č. 10236276001)
- $\geq 99,9\%$ absolutní ethanol (EtOH; Merck kat. č. MFCD00003568)
- 96% etanol (Lachner, kat.č. 20025-A96-M1000-1)
- agaróza (Amresco, kat. č. 0491B70)
- blokovací činidlo (Roche, kat.č. 11096176001)
- bovinní sérum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, kat. č. A3294-100G)
- biotin-11-dUTP (Roche, kat. č. 11093070910)
- celulóza Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Industry, kat. č. 150422-01)
- deionizovaný formamid (Millipore, kat. č. S4117)
- dextran sulfát (Carl Roth, kat.č. 9042-14-2)
- DIG-Nick translation Mix (Roche, kat. č. 11745816910)
- dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA ; Sigma Aldrich, kat. č. E7889)
- dihydrogencitrát sodný ($C_6H_7NaO_7$; Carl Roth, kat. č. R.HN13.1)
- dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 ; Sigma Aldrich, kat. č. P8416)

- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich, kat. č. 10039-32-4)
- Draselná sůl kyseliny 2-(N-morfolino)ethansulfonové (MES; Duchefa Biochemie, kat. č. M1503)
- Entellan (Sigma-Aldrich, kat. č. 108-88-3)
- Evansova modř (Sigma-Aldrich, kat. č. 314-13-6)
- fenol (Sigma-Aldrich, kat. č. 33517)
- formamid (Milipore, kat. č. S4117)
- glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G5516)
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich kat. č. 10028-24-7)
- hydroxid draselný (KOH; Sigma Aldrich, kat. č. 60130)
- hydroxid sodný (NaOH; Sigma Aldrich, kat. č. S8045)
- chlorid draselný (KCl; Sigma-Aldrich, kat. č. 30076-AP0)
- chlorid sodný (Lachner, kat. č. 30093-AP0)
- chlornan sodný (NaClO ; Sigma-Aldrich, kat. č. 1056142500)
- kolchicin (Sigma-Aldrich, kat. č. C9754)
- koňské sérum (Sigma-Aldrich, kat.č.H0146-5ML)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA; Sigma-Aldrich, kat. č. 10378-23-1)
- kyselina mléčná ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$; Lachner, kat. č. 201-196-2)
- kyselina octová (Lachner, kat. č. 61019-001-P0000-1)
- kyselý fuchsin ($\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$; Sigma.Aldrich, kat. č. 857343)
- lak na nehty (She, Česká republika)
- lososí spermie ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; Invitrogen, kat. č. AM9680)
- Lugolův roztok (I_2/KCl ; Sigma-Aldrich, kat. č. 32922)
- malachitová zeleň (Sigma-Aldrich, kat. č. 13-05722)
- methanol (Merck, kat. č. MFCD00004595)
- monohydrát kyseliny citrónové (Sigma-Aldrich, kat. č. 5949-29-1)
- Murashige a Skoog (MS) médium, basal salt mixture (Duchefa Biochemie, kat. č. M0221.0050)
- pektolyáza Y23 (Duchefa, kat. č. 9033-35-6)
- protilátka anti-digoxigenin konjugovaná s fluorescein isothiokyanátem (FITC; Roche, kat. č. 11207741910)
- protilátka streptavidin-Cy3 (Molecular Probes, kat. č. SA1010)
- RNáza A (Thermo Fisher, kat. č. EN0531)
- ROTI®-Histol (Carl Roth, kat. č. 8028-48-6)
- Roti®-Plast 100 % parafin (Carl Roth, kat. č. 8002-74-2)

- Sacharóza (Lachner, kat. č. 10135-AP0)
- Toluidinová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. 6586-04-5)
- tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris; Sigma-Aldrich, kat. č. 77-86-1)
- Triton X100 (Sigma-Aldrich, kat. č. T8787)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416)
- Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, kat. č. H-1000-10)

4.3 Soupravy

- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. P553)
- Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research, kat. č. R1055)
- RevertAiD First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher, kat. č. K1621)

4.4 Roztoky a jejich příprava

0,1% Evansova modř

- 100 mg Evansova modř
- 100 ml deionizované vody

0,1% kolchicin

- 100 mg kolchicin
- 100 ml deionizovaná voda
- kapka Tween-20

½ MS médium

- 3,6 g MS média
- 20 g sacharóza
- 1 g MES
- 6 g agar
- pH = 5,8 (KOH)
- doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou
- sterilizace autoklávováním

0,5 M EDTA (pH = 4)

- 18,61 g EDTA rozpustit v 80 ml deionizované vody
- pH = 4 (NaOH)
- doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou

0,5% tetrazolium

- 300 mg 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid
- 60 ml deionizované vody

1% Toluidinová modř

- 1 g Toluidinové modř
- 100 ml deionizované vody

1M KCl

- 37,3 g KCl
- rozpustit v 500 ml deionizované vody

1×KCl pufr

- 750 µl 1M KCl
- 75 µl 0,5M EDTA (pH = 4)
- Doplnit do objemu 10 ml deionizovanou vodou

4% formaldehyd

- 5,4 ml 37% formaldehydu
- 5ml 10×PBS
- Doplnit vodu do 50 ml (vždy připravit čerstvé)

7% NaClO

- 7 ml chlornan sodný
- 3 ml deionizované vody
- 100 µl Tween-20

10×PBS

- 80 g NaCl
- 2g KCl
- 17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O
- 2,4 g KH₂PO₄
- Rozpustit v objemu 1000 ml deionizované vody

20×SSC

- 175,3 g NaCl
- 64,2 g C₆H₇NaO₇
- Rozpustit v objemu 1000 ml deionizované vody

Alexandrovo barvivo

- 20 ml 95% EtOH
- 20 mg malachitové zeleně
- 50 ml deionizované vody
- 40 ml glycerolu
- 100 mg kyselého fuchsinu
- 5 g fenolu
- 0,5–1 ml kyseliny mléčné

Blokovací pufr

- 0,3 g BSA rozpustit v 1 ml koňského séra
- 1 ml 10×PBS
- 8 ml deionizované vody
- 10 µl Tween-20
- Skladovat při – 20 °C

Enzym

- 0,2 g celulózy
- 0,05 g pektolýázy
- 5 ml 1×KCl pufr

Inkubační pufr

- 0,1 g BSA rozpustit v 2 ml 20×SSC
- 8 ml deionizované vody
- 20 µl Tween-20
- přefiltrovat přes ø 0,22µm filtr
- skladovat při – 20 °C

Otto I

- 4,2 g monohydrátu kyseliny citrónové
- 1 ml Tween-20

- doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou
- přefiltrovat přes \varnothing 0,22 μ m filtr
- skladovat při 4 °C

Otto II

- 28,65 g Na₂HPO₄·12H₂O
- doplnit do objemu 200 ml deionizovanou vodou
- přefiltrovat přes \varnothing 0,22 μ m filtr
- Přidat před použitím DAPI (konečná koncentrace 4 μ g/ml)

RNáza A

- 1,5 μ l RNáza A (zásobní roztok 10 mg/ml)
- 298,5 μ l 2 \times SSC

TE pufr

- 15,759 g Tris a 9,92 g Na₂EDTA rozpustit v 800 ml deionizované vody
- pH = 7,6 (HCl)
- doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou

4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- analytické váhy (Sartorius)
- automatické pipety (Nichipet EXII, Nichiryo)
- automatická třepačka (Heidolph Reax)
- epifluorescenční mikroskop AxioImager Z2 (Zeiss) s vybaveným DSD2 otáčejícím se diskem a konfokálním modulem (Andor), spojený s monochromatickou Zyla 4.2 kamerou (Andor)
- centrifuga myFuge Mini (Bechmark Scientific)
- digestoř (Merci)
- flowbox (Telstar)
- fotoaparát Nikon D90 (Nikon)
- fytotron (Weiss Technik)
- homogenizátor MM301 (Retsch)
- hybridizér Slide Moat (Boekel SCientific)
- magnetická míchačka (Variomag)
- mikroskop s fázovým kontrastem (Primo Star, Zeiss)
- mikrotom (Reichert)

- nanodrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, program ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- pH metr Inolab (WTW)
- průtokový cytometr (FACSAria II, SORP)
- růstová komora (Percival Scientific)
- standartní orbitální třepačka (VWR)
- stereoskopický mikroskop (SZX16, Olympus) s kamerou Regita 1300 QImaging a softwarem Qcapture ×64 (Olympus)
- světelný mikroskop (Olympus BX60) s kamerou Promicra 3-3CP (Sony)
- termoblok (Medax)
- termocykler C1000 Touch (Bio-Rad)
- termocykler C1000 Touch CFX96TM Real-Time Systém (Bio-Rad) s CFX Maestro 2.0 softwarem (Bio-Rad)
- termocykler Mastercycler nexus (Eppendorf)
- termostat (Biological Thermostat, BT 120)
- vakuový systém (Labobase)
- vodní lázeň (Mettler)
- výrobce ledu (MF26, Scotsman)

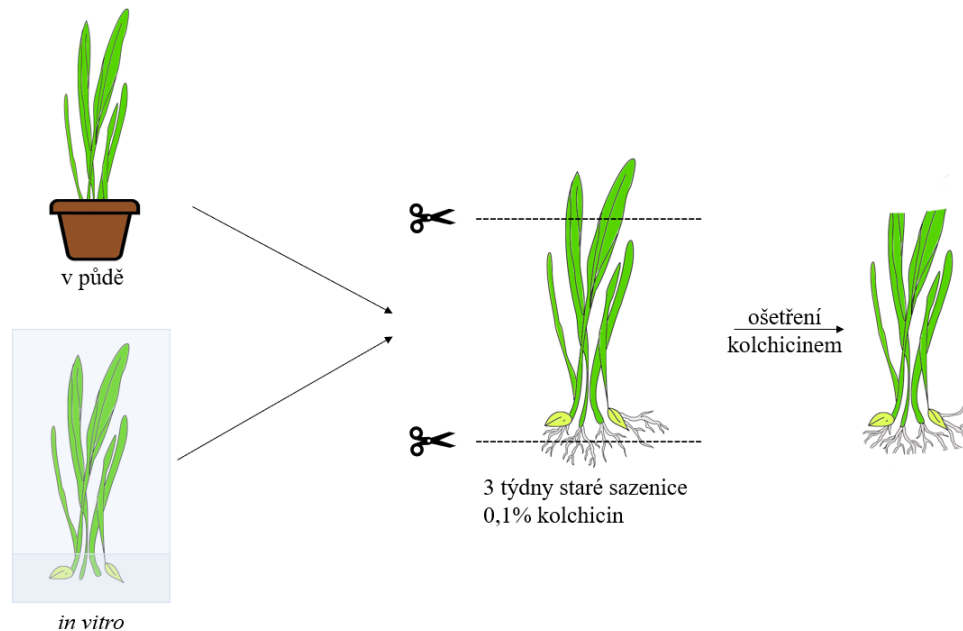
4.6 Software

- Adobe Photoshop CS5 6.0 (Adobe Systems Corporation, San Jose, CA)
- IQ3 (Andor)
- CFX Mastro 2.0 (Bio-Rad)
- ImageJ (veřejné vlastnictví)
- Imaris 9.2.1 (Bitplane, Oxford instruments), základní verze
- Imaris 9.2 (Bitplane, Oxford Instruments), rozšířená verze
- Inkscape (kolektiv autorů)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- MS (Olympus)
- Minitab (Minitab Inc.)
- Qcapture ×64 (Olympus)

4.7 Metodika

4.7.1 Tvorba tetraploidního ječmene

Příprava materiálu pro tetraploidizaci probíhala dvěma způsoby: rostlinný materiál byl pěstován v půdě nebo v *in vitro* podmínkách. Třítýdenní sazenice byly poté ošetřeny kolchicinem (Obrázek 7).



Obrázek 7: Schématické znázornění ošetření diploidních sazenic kolchicinem.

4.7.1.1 Výsev a podmínky růstu rostlin

Pro klíčení semen byly připraveny Petriho misky vystlané buničinou, překryté filtračním papírem a navlhčené destilovanou vodou. Do takto připravených Petriho misek bylo na navlhčený filtrační papír vyskládáno zhruba 15 semen a Petriho misky spolu se semeny byly umístěny za účelem stratifikace neboli synchronizace klíčení do lednice při 4 °C na 48 hodin.

Po uplynutí 48 hodin byly Petriho misky přeneseny do termostatu, kde byly uchovávány ve tmě při 25 °C po dobu dalších 48 hodin. Poté byly semena přemístěna do malých květináčů o rozměrech 5×5×5 cm naplněných směsí zeminy a písku v poměru 3:1 (v/v) a ponechána v uzavřeném klimatizovaném prostoru tzv. fytotronu za daných podmínek: 16 hodin světla ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) při teplotě 20 °C, 8 hodin tmy při teplotě 16 °C a 60% vlhkosti jak za světla, tak i tmy po dobu jednoho týdne. Po týdnu byly rostliny divokého ječmene umístěny do vernalizační komory (krátkodenní režim; 8 h den při 4 °C, intenzita světla $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 16 h noc při 4 °C; vlhkost 85 %) na tři týdny. Pro ošetření kolchicinem (popsáno níže) byly použity tři týdny staré semenáčky kultivarů Morex a Compana. Po vernalizaci byly semenáčky divokého ječmene opět přeneseny do fytotronu (16 hodin světla při teplotě 20 °C, 8 hodin tmy při teplotě 16 °C a 60% vlhkosti) a zde byly ponechány další dva týdny před ošetřením kolchicinem.

4.7.1.2 Sterilizace semen

Semena kultivarů Morex a Compana a divokého ječmene byla sterilizována ve flowboxu. 15 semen každého genotypu bylo sterilizováno zvlášť v 15ml zkumavce typu Falcon pomocí 5 ml 70% ethanolu (EtOH). Obsah zkumavky byl míchán převrácením zkumavky po dobu 5 minut. Po uplynutí časového intervalu byl 70% EtOH odebrán a nahrazen 5 ml 7% NaClO. Obsah zkumavky byl opět míchán stejným způsobem a po uplynutí 7 minut byl 7% NaClO odebrán. Semena byla následně promývána sterilní vodou po dobu 5 minut celkově čtyřikrát. Po posledním promytí byla voda odstraněna a nahrazena čistou sterilní vodou, tak aby byla všechna semena v ní ponořena. Takto vysterilizovaná semena byla přes noc ponechána v lednici při 4 °C.

4.7.1.3 Preparace embrya a *in vitro* podmínky růstu rostlin

Vysterilizovaná semena spolu se sterilní vodou byla ve flowboxu přenesena ze zkumavky typu Falcon do Petriho misky. Petriho miska byla následně umístěna pod stereoskopický mikroskop umístěný ve flowboxu a za pomoci vysterilizované pinzety a skalpelu byla provedena preparace. Tímto způsobem získaná embrya byla následně přenesena na sterilní průhledné plastové krabičky (15×10×12 cm s připraveným ½ MS s 0,6% agarem) a uzavřeny pomocí parafilmu. Poté byly tyto krabičky umístěny do růstové komory (16 h světlo – 30 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ /8 h tmy při 21 °C) po dobu tří týdnů. Po uplynutí daného časového úseku byly semenáčky připraveny pro ošetření kolchicinem.

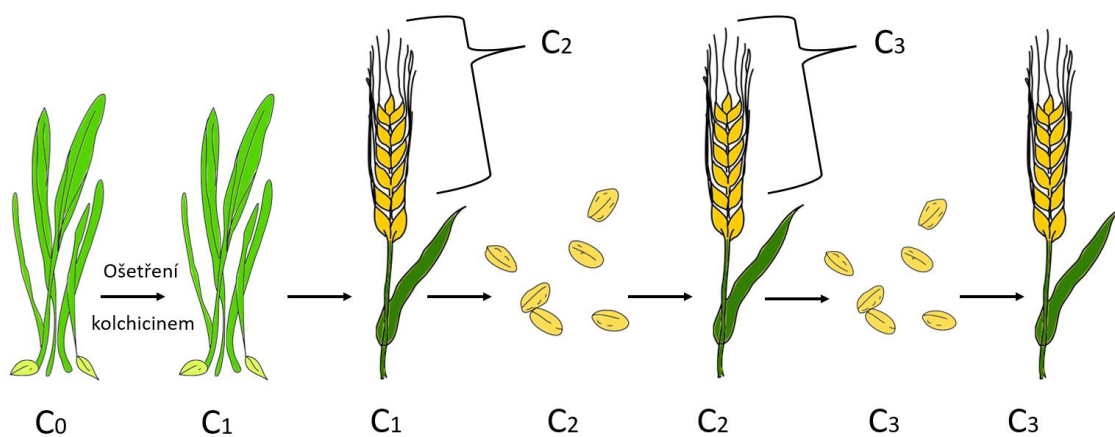
4.7.1.4 Ošetření kolchicinem

Po uplynutí doby tří týdnů byly jednotlivým sazenicím všech tří genotypů (Morex, Compana, divoký ječmen) pěstovaných jak v zemině, tak v *in vitro* podmínkách opláchnuty a následně zastříženy kořeny (cca 1 cm) a listy tak, aby celá rostlina měřila zhruba 20 cm (Obrázek 8).



Obrázek 8: Příprava sazenic pro ošetření kolchicinem (kultivar Morex). A – rostliny pěstované *in vitro*; B – rostliny pěstované v půdě; C – Sazenice umístěny do zkumavek typu Falcon před nalitím roztoku kolchicinu.

Zkrácené rostlinky byly následně přemístěny do 50ml zkumavky typu Falcon s 0,1% kolchicinem s kapkou Tweenu (příprava a manipulace s kolchicinem byla provedena školitelkou Mgr. Annou Nowickou, Ph.D.), tak aby došlo k ponoření kořenů a hypokotylu. Rostliny byly následně inkubovány na světle při teplotě 21 °C v různých časových intervalech, a to po dobu 6, 12, 16 nebo 24 hodin. Po uplynutí konkrétního časového úseku byl kolchicin odstraněn proudem tekoucí vody a takto vytvořené tetraploidní rostliny byly zasazeny do květináčů o velikosti 15×15×15 cm naplněných směsí zeminy a písku v poměru 3:1 (v/v) a ponechány ve fytotronu (16 hodin světla – 20 °C, 8 hodin tma – 16 °C, 60% vlhkost) po dobu 8 týdnů. Tímto způsobem byla vytvořena první generace tetraploidní linie (Obrázek 9).

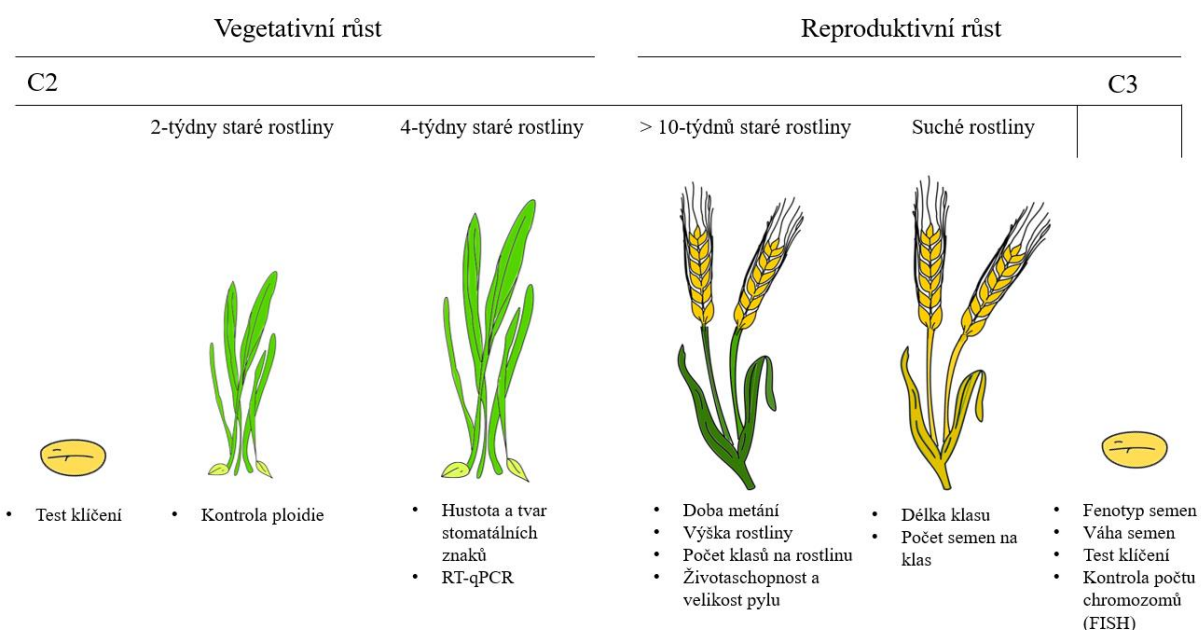


Obrázek 9: Schématické znázornění jednotlivých generací nově vytvořené tetraploidní linie. C – kolchicin; 1–3 – čísla jednotlivých generací.

4.7.1.5 Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie

Šest týdnů po ošetření kolchicinem byla provedena kontrola tetraploidizace prostřednictvím průtokové cytometrie. Jako materiál sloužily listy jednotlivých odnoží ječmene (C1 generace) všech tří genotypů (Morex, Compana, divoký ječmen). Zhruba 1 cm² každého listu byl homogenizován žiletkou v Petriho misce obsahující 500 µl roztoku Otto I a následně obarveny 1 ml roztoku Otto II obsahujícího DAPI. Poté byly takto připravené vzorky analyzovány pomocí CyFlow Space průtokového cytometru (Sysmex-Partec) vybaveného UV-LED diodami. Měření prováděné na průtokovém cytometru bylo prováděno spolu se školitelkou Mgr. Annou Nowickou, Ph.D.

4.7.2 Charakterizace a selekce stabilních tetraploidních linií



Obrázek 10: Experimentální návrh charakterizace a selekce tetraploidních linií.

4.7.2.1 Vegetativní fáze růstu rostlin

Semena diploidních kultivarů Morex, Compana a divokého ječmene a semena (C2 generace) sesbírána z tetraploidních odnoží (C1) byla vyklíčena a pěstována tak, jak je popsáno v podkapitole „Výsev a podmínky růstu rostlin“. Před přemístěním semenáčků do větších květináčů, byla u dvou týdnů starých sazenic změřena jejich ploidie stejně jako v kapitole „Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie“.

4.7.2.2 Hustota a tvar stomatálních znaků

Stomatální otisky byly provedeny metodou „Nail polish“. Stručně řečeno, stomatální otisky byly získány prostřednictvím laku na nehty aplikovaného na abaxiální stranu listů čtyři týdny starých rostlin. Lak na nehty (She, Česká republika) byl aplikován na povrch listu v tenké vrstvě a ponechán na vzduchu po dobu 5–7 minut. Po zaschnutí laku byl lak na nehty pomocí pinzety z povrchu listu sundán a přenesen na mikroskopické sklíčko. Pro zachycení snímků stomatálních otisků byl použit světelný mikroskop (Olympus BX60) s kamerou Promicra 3-3CP (Sony) a MS software (Olympus). Počet průduchů byl poté stanoven ručně počítáním průduchů jeden po druhém v každém jednotlivém snímku. Plocha a obvod průduchů byla změřena v ImageJ.

4.7.2.3 Porovnání exprese vybraných genů kvetení u diploidních a tetraploidních rostlin

4.7.2.3.1 Izolace RNA

RNA byla izolována z rostlin kultivaru Morex s ploidii 2x a 4x. Kultivar Morex byl vybrán z důvodu anotovaného genomu. Pro každou ploidii byla provedena 3 biologická opakování. Pro porovnání exprese genů byla ze 4-týdnů starých rostlin odebrána část listu a vložena do 2 ml mikrozkuvek se skleněnými kuličkami. Mikrozkuvky byly následně vloženy do tekutého dusíku a poté byly homogenizovány v homogenizátoru Retsch TissueLyser (Qiagen) po dobu 2 minut a frekvenci 30 Hz. Následná izolace RNA byla provedena prostřednictvím kitu Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) podle instrukcí výrobce. Čistota a koncentrace izolované RNA byla poté změřena na NanoDropu One Microvolume UV-Vis a skladována při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7.2.3.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla reverzní transkripcí přepsána do komplementární DNA (cDNA) prostřednictvím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher) podle instrukcí výrobce. Pro přepis do cDNA byly použity 2 μg RNA a oligo (dT)₁₈ primery. Získaná cDNA byla poté zředěna v poměru 1:1 s RNase-free vodou a skladována při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7.2.3.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí

Pro určení relativní exprese tří genů kvetení *PHOTOPERIOD 1* (*HvPPD*), *VERNALIZATION 1* (*HvVRNI*) a *FLOWERING LOCUS T* (*HvFT*) u diploidní a tetraploidní linie kultivaru Morex byla provedena kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR) s využitím termocykleru se systémem pro vyhodnocování PCR v reálném čase C1000 Touch Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad). Vzorčky byly napipetovány ve třech biologických a třech technických opakováních do 96-jamkové destičky, kde probíhala samotná RT-qPCR. Jako referenční gen byl použit *AKTIN* (*HvAKT*). Reakční směs byla připravena podle Tabulky 1, podmínky reakce byly nastaveny podle Tabulky 2 a primery, které byly použity jsou uvedeny v Tabulce 3. Získaná data prostřednictvím RT-qPCR byla následně vyhodnocena pomocí $2^{-\Delta\Delta C_q}$ metody prostřednictvím softwaru CFX Maestro 2.0 software (Bio-Rad).

Tabulka 1: Reakční směs pro RT-qPCR.

Komponenty reakce	Objem 1 vzorku reakce [μ l]
2×SYBR Green Master Mix	7,5
Forward primer, 10 mmol·l ⁻¹	0,4
Reverse primer, 10 mmol·l ⁻¹	0,4
cDNA templát	1
Sterilní voda	5,7
Celkový objem	15

Tabulka 2: Nastavení teplotního programu pro RT-qPCR.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	10 s	44
Anelace	60	40 s	
Extenze	72	10 s	
Analýza teploty tání	65 → 94	0,5 °C/s	1

Tabulka 3: Seznam použitých genů a primerů pro RT-qPCR.

Gen	Sekvence primeru (5' → 3')	Zdroj
<i>HvPPD</i>	F: CAAATCAAAGAGCGGCGATC R: TCTGACTTGGGATGGTTCACA	Hemming et al., 2008
<i>HvVRN1</i>	F: TGAAGCTCAGAAATGGATTCCG R: TATGAGCGCTACTCTTATGC	Trevaskis et al., 2006
<i>HvFT</i>	F: ATCTCCACTGGTTGGTGACAGA R: TTGTAGAGCTCGGCAAAGTCC	Yan et al., 2006
<i>HvAKT</i>	F: GCCGTGCTTTCCCTCTATG R: GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA	Trevaskis et al., 2006

*F = forward primer; R = reverse primer

4.7.2.4 Reprodukční fáze růstu rostlin

4.7.2.4.1 Fenotypová analýza rostlin

U rostoucích diploidních a tetraploidních rostlin byla sledována doba metání, což je fáze růstu rostliny, kdy z listu vyčnívá právě polovina klasu (fáze 55 podle Zadakovy stupnice; Zadoks et al., 1974; Alqudah a Schnurbusch, 2017). U každé rostliny byla určena doba metání – počet dní od vysazení do doby metání rostliny. Dále byla změřena výška rostliny za pomoci metru, kde byla měřena vzdálenost od země až k nejvyššímu vrcholu rostliny. Poté byl spočítán počet odnoží u jednotlivých rostlin. Všechna měření byla provedena pro 2–6 rostlin na genotyp.

4.7.2.4.2 Kontrola životaschopnosti a velikosti pylu

Následně byla prováděna kontrola životaschopnosti pylu, a to jak u diploidních, tak u tetraploidních rostlin. Jako první byly vyjmuty pomocí pinzety prašníky. Lehkým poklepáním prašníku na podložní sklíčko došlo k uvolnění pylu, který byl následně obarven prostřednictvím Alexandrova barvení a zakryt krycím sklíčkem. Takto připravená sklíčka byla následně inkubována 30 minut při teplotě 4 °C. Po uplynutí inkubace bylo provedeno mikroskopování s využitím světelného mikroskopu (Olympus BX60) s kamerou Promicra 3-3CP (Sony) a MS softwaru (Olympus). Pro každý genotyp (Morex, Compana, divoký ječmen) a ploidi (2x, 4x) byly připraven vždy dva preparáty na rostlinu. U každého preparátu byla provedena pozorování vždy v 10 zorných polích. Snímky byly použity pro určení četnosti životaschopných pylových zrn (=životaschopná zrna/všechna zrna) a měření plochy (velikosti) pylových zrn pomocí ImageJ.

4.7.2.4.3 Fenotypová analýza suchých klasů

Pro bližší charakterizaci tetraploidních linií byla změřena délka jednotlivých klasů za pomoci pravítka a také přepočítána frekvence počtu semen na jeden klas. Tato semena byla poté rozdělena do dvou skupin a to na normálně vyvinutá semena a abortovaná vajíčka.

4.7.2.4.4 Charakterizace semen tetraploidních a diploidních linií

Měsíc po sklizení byla suchá semena jednotlivých genotypů (Morex, Compana, divoký ječmen, C3 generace) a ploidií (2x, 4x) zvážena prostřednictvím analytických vah. Získaná váha byla poté přepočítána na hmotnost tisíce semen pomocí (HTS) vzorce: $HTS = (1000 \times \text{hmotnost}) / \text{počet semen}$. Pro každý genotyp byly provedeny tři biologické repliky. Poté byla semena vyfotografována digitálním fotoaparátem Nikon D90 (Nikon).

4.7.2.4.5 Test klíčení semen generace C2 a C3

Pro test klíčení bylo použito 10 semen pro každý genotyp a ploidii ve třech biologických replikách. Semena byla přenesena na Petriho misky (jedna miska = jeden replikát) vystlané buničinou, filtračním papírem a navlhčené destilovanou vodou. Takto připravené Petriho misky byly přeneseny do lednice při teplotě 4 °C na 48 hodin. Po uplynutí 48 hodin byly Petriho misky přeneseny do termostatu, kde byly uchovávány ve tmě při 25 °C po dobu dalších 48 hodin. Test klíčení byl vyhodnocen pomocí vzorce: počet vyklíčených semen/celkový počet semen.

4.7.2.5 Kontrola stability tetraploidních linií pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace

4.7.2.5.1 Příprava mitotických chromozomů

Synchronizované kořenové špičky byly použity pro přípravu metafázových chromozomů na základě literatury (Lysák et al., 1999) s modifikacemi. Tato část byla provedena pro semena diploidního a tetraploidního divokého ječmene (C3 generace) paní Zdeňkou Dubskou.

4.7.2.5.2 Fixace kořenů ječmene

Semenům byly odřezány kořínky a byly vloženy do 2ml mikrozkušavek naplněných sterilní vodou uložených na ledu. Po uplynutí 2 minut byla voda nahrazena 90% kyselinou octovou a inkubována po dobu 10 minut na ledě. Po uplynutí daného časového úseku byla kyselina octová odstraněna a následně bylo prováděno promývání 70% EtOH, to celkem třikrát s tím, že potřetí byl 70% EtOH ponechán v mikrozkušavce. Tímto způsobem zafixované kořínky byly skladovány při teplotě – 20 °C maximálně po dobu 2 měsíců.

4.7.2.5.3 Příprava sklíček

Sklíčka s metafázovými chromozomy byla připravena pomocí tzv. drop technique (Danilova et al., 2012). Ve zkratce do 2 ml mikrozkušavek naplněných sterilní vodou uložených na ledu byly vloženy zafixované kořínky. Bylo prováděno promývání sterilní vodou celkově třikrát 3 minuty. Po třetím kole promývání byla voda odstraněna a nahrazena 1×KCl po dobu 5 minut. Mezitím byly připraveny nové 1,5ml mikrozkušavky s 20 µl enzymu. Po uplynutí 5 minut byl 1×KCl odstraněn a kořínkům byly uříznuty špičky, které byly poté vloženy do nově připravených mikrozkušavek s enzymem (směs 4% celulózy Onzuka R-10 a 1% pektolýzy Y-23 v 1×KCl) a inkubovány ve vodní lázni přednastavené na 37 °C 58 a 73 minut pro 2x a 4x v tomto pořadí. Po skončení inkubace byla odebrán enzym a reakce byla zastavena TE puřrem, který byl ponechán ve zkumavce 5 minut na ledu. Následně byly prováděny tři kola promývání 100% EtOH každé 2 minut. V mezičase byl připraven roztok kyseliny octové a methanolu (9:1) a po třech kolech promývání 100% EtOH, byl EtOH odstraněn a nahrazen směsí

kyseliny octové a methanolu. Kořínky byly poté pomocí opačného konce očkovací smyčky ve zkumavce lehce rozdrceny a poté ponechány zhruba 5 minut na ledě. Dále byla připravena vlhká komora s podložními sklíčky, na které byl kapán pipetou z výšky roztok s kořínky o objemu 7 μ l na jedno sklíčko. Vlhká komora byla poté z části zakryta a ponechána tak 20 minut. Po uplynutí 20 minut byla suchá sklíčka zkontrolována pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Primo Star, Zeiss). Pro další experimenty byla použita sklíčka s minimálně pěti metafázemi.

4.7.2.5.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace byla provedena na základě literatury (Nowicka et al., 2023) s následujícími modifikacemi. Sondy pro hybridizaci byly označeny školitelkou Mgr. Annou Nowickou, Ph.D.

Ze spodu připravených sklíček prostřednictvím diamantového pera byla označena oblast s chromozomy. Sklíčka byla umístěna do Coplin nádoby a promývána dvakrát po dobu 5 minut v 2 \times SSC. Poté bylo provedeno ošetření sklíček RNAázou A 30 minut při teplotě 37 $^{\circ}$ C ve vlhké komoře. Poté byla sklíčka opět dvakrát promývána 5 minut 2 \times SSC a následně po dobu 1 minuty promývána v 1 \times PBS. Dále byla provedena fixace sklíček v 4% formaldehydu v 1 \times PBS při pokojové teplotě 20 minut v digestoři. Následně byla sklíčka třikrát promývána v 1 \times PBS pokaždé 5 minut při pokojové teplotě a mírně míchána na třepačce. V průběhu promývání byl připravený hybridizační mix podle Tabulky 4. Tento mix byl denaturován 4 minuty při 95 $^{\circ}$ C v termocykleru a poté ponechán 5 minut na ledě. Takto připravený hybridizační mix byl napipetován na sklíčko a denaturován 4 minuty při 80 $^{\circ}$ C (Mastercycler nexus). Po ukončení denaturace byla sklíčka okamžitě přemístěna do vlhké komory a inkubována při 37 $^{\circ}$ C přes noc.

Tabulka 4: Příprava hybridizačního mixu pro fluorescenční *in situ* hybridizaci.

Komponenty	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	20 μ l/1 sklíčko
Formamid	100%	50%	10 μ l
SSC	20x	1x	1 μ l
Dextran sulfát	50%	12,5%	5 μ l
45S rDNA (digoxigenin)	10 μ g/ μ l	400 ng/ μ l	1 μ l
5S rDNA (biotin)	10 μ g/ μ l	400 ng/ μ l	1 μ l
CEREBA-Cy5	10 μ g/ μ l	400 ng/ μ l	1 μ l
Lososí spermie	10 mg/ml	0,5 μ g	1 μ l
Sterilní voda	-	-	doplněno do 20 μ l

Druhý den byla sklíčka promývána v Coplin nádobě ve vodní lázni předehřáté na 42 °C, nejprve dvakrát v 2×SSC 7 minut, jednou v 0,1×SSC 10 minut, a nakonec jedenkrát v 2×SSC 5 minut. Následně byla sklíčka promývána dvakrát 7 minut v 4×SSC již za pokojové teploty.

Sklíčka po promývání byla osušena, převrstvena 100 µl blokovacího pufru a inkubována ve vlhké komoře 30 min při 37 °C. Po uplynutí daného časového úseku byla provedena další inkubace se sekundárními protilátkami – straptavidin-Cy3 ředěný v inkubačním pufru v poměru 1:200 (v/v) pro biotinem značené sondy a anti-digoxigenin-FITC ředěný v inkubačním pufru 1:200 (v/v) pro digoxigeninem značené sondy – ve vlhké komoře při 37 °C 1 hodinu. Následně bylo provedeno promývání v Coplin nádobě v 4×SSC ve vodní lázni při teplotě 37 °C třikrát 5 minut. Poté byla provedena dehydratace vzorků promýváním v řadě ethanolů v tomto pořadí: 70% EtOH, 90% EtOH a 96% EtOH celkově 6 minut. Na konec byla sklíčka převrstvena roztokem DAPI (1 µg·ml⁻¹) a zakryta krycím sklíčkem.

Pro analýzu a zachycení fluorescenčních signálů byl použit epifluorescenční mikroskop AxioImager Z2 (Zeiss) vybavený konfokálním modulem DSD2 a kamerou Zyla 4.2 (oba Andor). Snímky byly získány v IQ3 systému (Andor) zvlášť pro každý fluorochrom využívající dané excitační filtry (DAPI λ = 390/40 nm, GFP λ = 482/18 nm, RFP λ = 561/14 nm, Cy5 λ = 640/14 nm) a emisní filtry (DAPI λ = 452/45 nm), GFP λ = 525/45 nm, RFP λ = 609/54 nm, Cy5 λ = 676/29 nm).

K přípravě karyotypů bylo provedeno párování homologních chromozomů na základě polohy lokusů *rDNA* a signálů *CEREBA*-centromerické sondy. Klasifikace jednotlivých chromozomů byla provedena podle (Kapousi et al., 2012). Samotné karyotypy byly sestaveny v Adobe Photoshop CS5 6.0.

4.7.3 Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen

4.7.3.1 Interploidní křížení

Jednotlivé klasy divokého ječmene byly pozorovány, aby byly připraveny na kastraci v době, kdy prašníky zbarveny světle zeleně začaly žloutnout, ale zároveň ještě nedošlo k uvolnění pylu. Kastrace byla prováděna prostřednictvím pinzety, kdy byly všechny tři prašníky odejmuty z jednotlivých kvítků. Vykastované klasy byly poté zakryty malými sáčky a v případě diploidních matek byly provedeno opylení 3–4 dny po kastraci, u tetraploidních matek 4–5 dnů po kastraci. Křížení bylo provedeno ve čtyřech kombinacích, a to křížení diploidní otce s diploidní matkou (2x × 2x), diploidního otce s tetraploidní matkou (2x × 4x), tetraploidního otce s diploidní matkou (4x × 2x) a tetraploidního otce s tetraploidní matkou (4x × 4x). Tato část byla provedena školitelkou Mgr. Annou Nowickou, PhD.

Klasy v den opylení (anglicky day of polination; DOP) byly označeny číslem (ID) a datumem. Tyto informace byly zaznamenány do tabulek vytvořených v Microsoft Excel. DAP se poté počítal podle vzorce: DAP = DOP + x, kde x = očekávané DAP.

4.7.3.2 Hodnocení fenotypů semen

Klasy se suchými semeny byly sklizeny okolo 50 DAP z plně suchých mateřských rostlin a skladovány 30 dní při 20 °C. 15–20 klasů bylo hodnoceno na základě z něj získaných semen na: normální semena (NS), pozdě-abortovaná semena (angl. late-aborted seed – LAS) a brzy-abortovaná semena (angl. early-aborted seed – EAS). LAS dosáhla více jak poloviny délky NS, zatímco EAS nedosáhlo poloviny délky NS. Poté byla semena jednotlivých kombinací zvážena a zaznamenána stejně jako v kapitole „Charakterizace semen tetraploidních a diploidních linií“ a následně byl proveden také test klíčení.

4.7.3.3 Test životaschopnosti buněk barvením tetrazoliem

Kontrola viability suchých semen byla provedena barvením tetrazoliem. Jako první byla semena (cca 10) umístěna do kádinky, zalita destilovanou vodou a umístěna do lednice (4 °C) přes noc. Takto namočená semena byla poté přeřezána podélně a umístěna do nových kádinek s 0,5% roztokem tetrazolia a inkubována v termostatu nastaveného na teplotu 37 °C po dobu 1, 5 hodiny. Po uplynutí daného časového úseku byl roztok tetrazolia odstraněn a nahrazen destilovanou vodou tak, aby byla všechna semena ponořena, a tímto způsobem byla semena uchovávána v lednici (4 °C), aby nedocházelo k jejich vysušování. Pro dokumentaci byla semena vyfocena prostřednictvím stereoskopického mikroskopu SZX16 (Olympus). Snímky byly pořízeny kamerou Regita 1300 QImaging a softwarem Qcapture ×64 (Olympus).

4.7.3.4 Test buněčné smrti barvením Evansovou modří

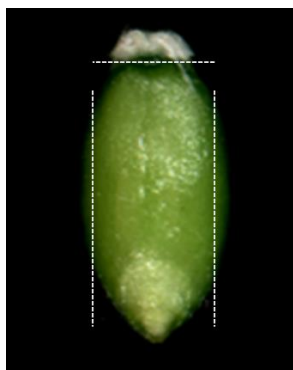
16 DAP semena byla příčně přeřezána prostřednictvím skalpelu a přemístěna do kádinek a zalita 0,1% roztokem Evansovi modří. Po uplynutí 2 minut byla Evansova modř odebrána a semena byla následně dvakrát po dobu 5 minut promývána destilovanou vodou. Po posledním promytí byla voda odstraněna a nahrazena čistou destilovanou vodou. Tímto způsobem byla semena uchovávána v lednici (4 °C) před samotným vyhodnocením, aby nedocházelo k jejich vysušování. Dokumentace byla provedena stejně jako v předcházející kapitole.

4.7.3.5 Histologická analýza

4.7.3.5.1 Fixace semen

V uzavíratelné nádobě v mikrovlnné troubě bylo ohřáto 180 ml destilované vody. K ní bylo přidáno 8 gramů paraformaldehydu a celá nádoba i s obsahem byla umístěna na míchačku za stálého odsávání vzduchu. Po rozpuštění paraformaldehydu bylo přidáno 100 µl NaOH, 400 µl Triton X–100 a 400 µl Tween 20 v tomto pořadí. Po rozpuštění všech přidávaných sloučenin byl roztok doplněn o 20 ml 10×PBS a chlazen na ledu. Po vychladnutí bylo zkontrolováno pH. V případě, kdy bylo pH vyšší jak 7, bylo upraveno přidáním HCl. Následně bylo do 50ml zkumavek typu Falcon nalito zhruba 20 ml

připraveného roztoku a opět chlazeno na ledu. Poté byla semena stará 16 DAP upravena ořezáním podle Obrázku 11 a vložena do připravených zkumavek a zakryta sítím, aby v dalším kroku nedošlo k jejich vyplavení na povrch. Zkumavky spolu se semeny byly vloženy do vakua po dobu celkově 1 hodiny s přerušením vakua každých 10 minut. Poté bylo síto odebráno a roztok nahrazen čerstvým roztokem a uložen do lednice (4 °C) přes noc.



Obrázek 11: Schématické znázornění ořezu semene (16 DAP) pro jeho fixaci. Bílé přerušované čáry znázorňují místa ořezu.

Další den byl fixační roztok nahrazen vychlazeným 50% EtOH a ponechán 90 minut na ledu, který byl následně nahrazen vychlazeným 70% EtOH a opět ponechán 90 minut na ledu. 70% EtOH byl poté nahrazen postupně 85% EtOH a 95% EtOH, kdy každý byl po nechán 90 minut v lednici (4 °C). Nakonec byl 95% EtOH nahrazen 100% EtOH a ponechán přes noc v lednici (4 °C).

Třetí den byl 100% EtOH nahrazen čerstvým 100% EtOH a ponechán v lednici (4 °C) 90 minut. Po uplynutí 90 minut byl EtOH odebrán a nahrazen čistým 100% EtOH a ponechán 60 minut za pokojové teploty. Následně byla připravena směs 50% EtOH a 50% Rotihistolu (1:1), 100% EtOH byl odebrán a nahrazen tímto roztokem (60 minut při pokojové teplotě). Poté byla prováděna série promývání 100% Rotihistolem celkově třikrát 60 minut při pokojové teplotě. Po posledním kole promývání byl Rotihistol odstraněn a nahrazen čistým 100% Rotihistolem s přídavkem vosku a inkubován při teplotě 50 °C.

Následující den byl rozpuštěn vosk při teplotě 60 °C, směs 100% Rotihistolu a vosku byla nahrazena tímto rozpuštěným voskem a inkubována ve vodní lázni při teplotě 60 °C. Další výměna vosku byla poté provedena večer. To bylo opakováno další dva dny, kdy dochází k výměně vosku ráno a večer.

Sedmý den byla semena s voskem přemístěna do silikonových forem. Termoblok byl předeřhřátý na 60 °C, na něj byly umístěny silikonové formy. Do forem byla nalita trocha rozpuštěného vosku a do něj bylo následně vloženo semeno a opět zalito voskem. Takto vyplněné formy byly poté schlazeny v ledové vodě a uloženy v lednici (4 °C).

4.7.3.5.2 Tvorba řezů pomocí mikrotomu

Zafixovaná semena ve vosku byla následně řezána na tenké řezy o tloušťce 5 a 10 mm pomocí mikrotomu. Takto nařezané řezy byly poté položeny lesklou stranou na podložní sklíčko. K řezům byla

poté přidána destilovaná voda a celé sklíčko i s vodou bylo položeno na termoblok přehřátý na 42 °C, aby došlo k narovnání řezu. Poté co dojde k narovnání řezu a dojde k jeho zprůhlednění, byla voda odebrána a sklíčko ponecháno na termobloku pro dosušení zhruba 5 minut.

4.7.3.5.3 Barvení řezů provedených mikrotomem

Sklička se 10 mm řezy byla za účelem odstranění vosku umístěna do Coplin nádoby a promývána jednotlivými roztoky po určitou dobu. Jako první byla sklíčka promývána dvakrát 100% Rotihistolem po dobu 10 minut. Následně byla provedena promývání EtOH všechna po dobu 1 minuty, a to v tomto pořadí: dvakrát 100% EtOH, dále jedenkrát 95% EtOH, 85% EtOH, 50% EtOH a 30% EtOH. Poté byla promyta destilovanou vodou opět po dobu 1 minuty a vzápětí 1×PBS po dobu 2 minut, 4% formaldehydem v 1×PBS po dobu 10 minut a na závěr byla provedena tři promývání 1×PBS každé po dobu 2 minut.

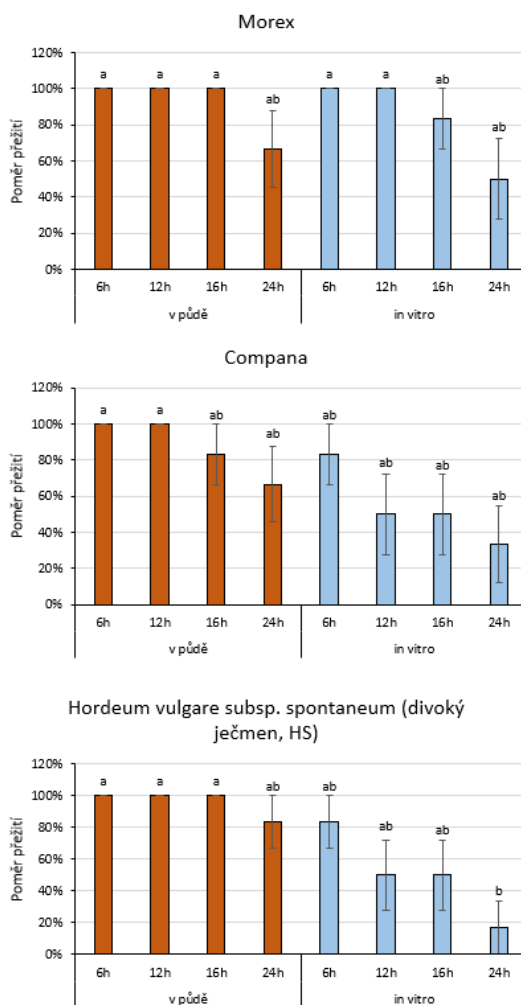
Takto připravená sklíčka s odstraněným voskem byla následně barvena, a to Toluidinovou modří a Lugolovým roztokem. Barvení Toluidinovou modří bylo prováděno tak, že jednotlivá sklíčka byla zalita 1% roztokem Toluidinové modří po dobu 1 minuty, následně dvakrát promyta destilovanou vodou, usušena a zakryta krycím sklíčkem s využitím Entellanu. Při barvení Lugolovým roztokem byla sklíčka barvena po dobu 30 sekund a následně jednou promyta destilovanou vodou, usušena a zakryta krycím sklíčkem s Entellanem.

Na závěr bylo prováděno samotné vyhodnocování jednotlivých barvení prostřednictvím světelného mikroskopu (Olympus BX60) s kamerou Promicra 3-3CP (Sony) a MS softwaru. Semena byla fotografována po částech a poté složena jako jeden obraz ve Photoshopu.

5 Výsledky

5.1 Tvorba tetraploidního ječmene

Za účelem tvorby tetraploidních linií byly rostliny pěstovány standartně v zemině a v *in vitro* podmínkách. Po uplynutí tří týdnů byly rostliny vystaveny působení 0,1% kolchicinu v různých časových intervalech: 6, 12, 16 a 24 hodin a následně bylo pozorováno, jaké množství rostlin ošetření kolchicinem přežilo. Data poté byla zaznamenána a zpracována v podobě grafů viz Obrázek 12.



Obrázek 12: Poměr přežití rostlin C1 generace pěstovaných v půdě a *in vitro* podmínkách po jejich vystavení kolchicinu. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) z 6 hodnocených rostlin. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

Nejvyšší celkový poměr přežití C1 rostlin byl pozorován u kultivaru Morex (Obrázek 12), přičemž rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách měly slabší poměr přežití, jak rostliny pěstované v půdě. Nejhůře na působení kolchicinem reagovali rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách po dobu působení kolchicinu 24 hodin.

Druhý nejvyšší celkový poměr přežití byl pozorován u divokého ječmene (Obrázek 12), kdy opět rostliny pěstované *in vitro* podmínkách měly razantně nižší poměr přežití, oproti rostlinám pěstovaných v půdě. Nejhůře na působení kolchicinem reagovali rostliny pěstované *in vitro* podmínkách po dobu působení kolchicinu 24 hodin.

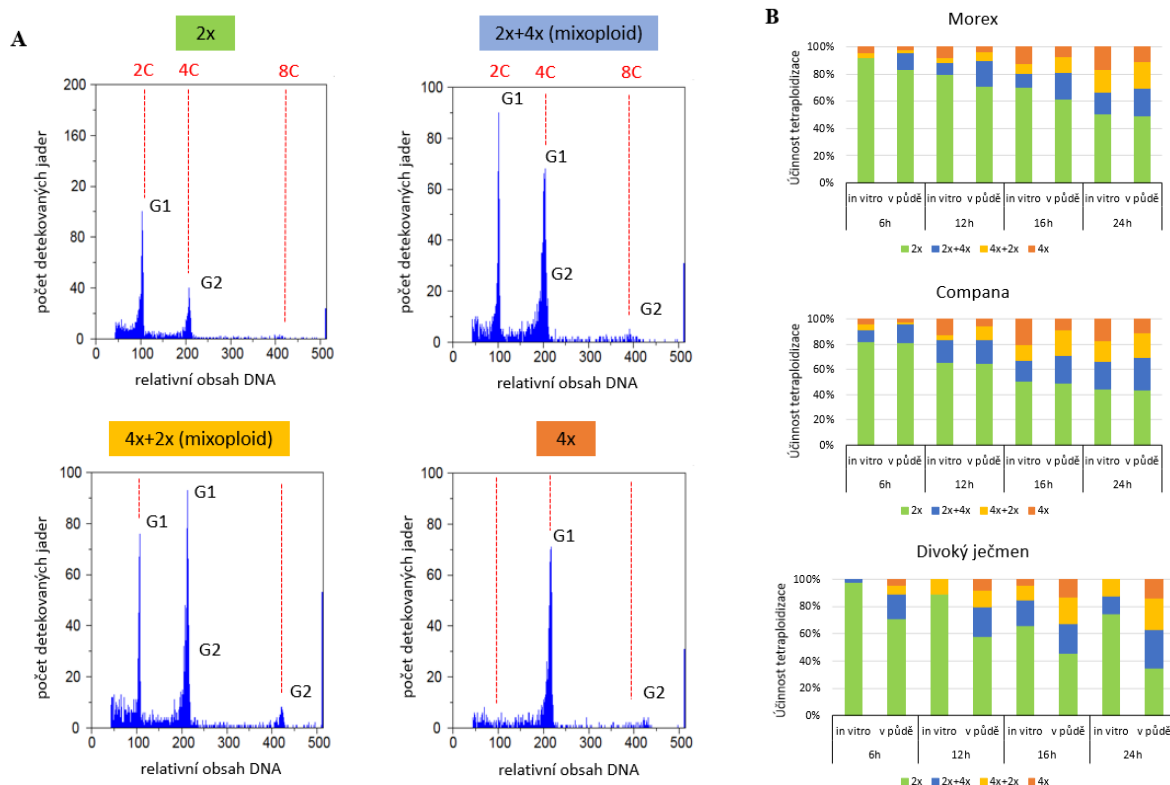
Nejnižší poměr přežití byl pozorován u kultivaru Compana (Obrázek 12). Opět byl pozorován horší průběh u rostlin pěstovaných *in vitro* podmínkách, nicméně pozorujeme i snížený poměr přežití u rostlin pěstovaných v půdě při působení kolchicinu po dobu 16 a 24 hodin. Stejně tak jako u kultivaru Morex a divokého ječmene, nejhůře reagovaly na působení kolchicinem rostliny pěstované *in vitro* podmínkách vystavené kolchicinu po dobu 24 hodin.

5.1.1 Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie

S cílem zjistit, zda vytvořené tetraploidní rostliny jsou skutečně tetraploidní, byla provedena kontrola prostřednictvím průtokové cytometrie. Jako materiál byly použity listy jednotlivých odnoží, které byly vyhodnoceny za pomoci získaných histogramů (Obrázek 13A).

Na základě tímto způsobem získaných dat bylo pozorováno, že úspěšnost tetraploidizace (4x) není 100%. Přestože cílem bylo získat čistě tetraploidní linie, lze i přesto pozorovat jak tvorbu diploidních (2x), tak dokonce tzv. mixoploidních ($2x+4x$; $4x+2x$) odnoží neboli odnoží s kombinací dvou ploidí (Obrázek 13A).

Poté byl proveden výpočet získaných výsledků z průtokové cytometrie. Na základě grafického zpracování byla pozorována různá účinnost tetraploidizace u tří genotypů (Morex, Compana, divoký ječmen). U kultivaru Morex se jako nejlepší způsob tvorby tetraploidní linie ukazuje být působení kolchicinem po dobu 24 hodin, a to u rostlin pěstovaných *in vitro* (17 %). Podobně je tomu u kultivaru Compana, kde se opět ukazuje být jako nejlepší způsob použít rostliny pěstované *in vitro*, ale po dobu 16 hodin (20 %). Naopak u divokého ječmene se jako nejlepší způsob tvorby tetraploidní linie ukazuje ošetření kolchicinem po dobu 16 hodin, avšak u rostlin pěstovaných v půdě (13 %; Obrázek 13B).



Obrázek 13: Účinnost tetraploidizace C1 generace u tří genotypů ječmene. A – Histogramy získané průtokovou cytometrií; 2C, 4C, 8C – obsah jaderné DNA daného píku; G1, G2 – fáze buněčného cyklu. Diploid – 2C = G1, 4C = G2; Tetraploid – 4C = G1, 8C = G2; Mixoploid – 2C = G1, 4C = G1/G2, 8C = G2. B – Procento diploidních, mixoploidních a tetraploidních odnoží na jednu rostlinu. Hodnoty jsou průměrem z 6 hodnocených rostlin. Každá rostlina pojímala 5 až 25 analyzovaných odnoží.

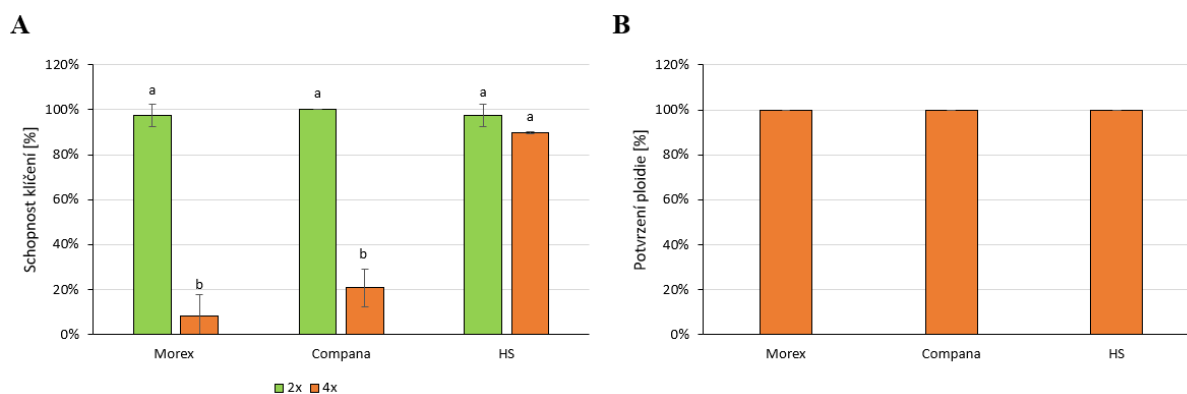
5.2 Charakterizace a selekce stabilních tetraploidních linií

5.2.1 Vegetativní fáze růstu

Jako první byla sesbírána semena (C2 generace) z tetraploidních odnoží (C1) Morex, Compana a divoký ječmen. Na těchto tetraploidních semenech byl proveden test klíčení a následná kontrola ploidie tetraploidních sazenic. Jako kontrola sloužila semena a sazenice diploidních rostlin.

Semena diploidních rostlin měla úspěšnost klíčení 100 %. Zatímco u tetraploidních linií kultivaru Morex a Compana dochází k značné redukci schopnosti klíčení zhruba na 10–20 %, kdežto tetraploidní linie divokého ječmene mají úspěšnost klíčení zhruba 90 % (Obrázek 14A).

Následně byla také změřena ploidie u dvou týdnů starých sazenic prostřednictvím průtokové cytometrie, která ukázala, že všechny vybrané tetraploidní linie z kapitoly „Kontrola účinnosti tetraploidizace pomocí průtokové cytometrie“ jsou skutečně tetraploidní viz Obrázek 14B.

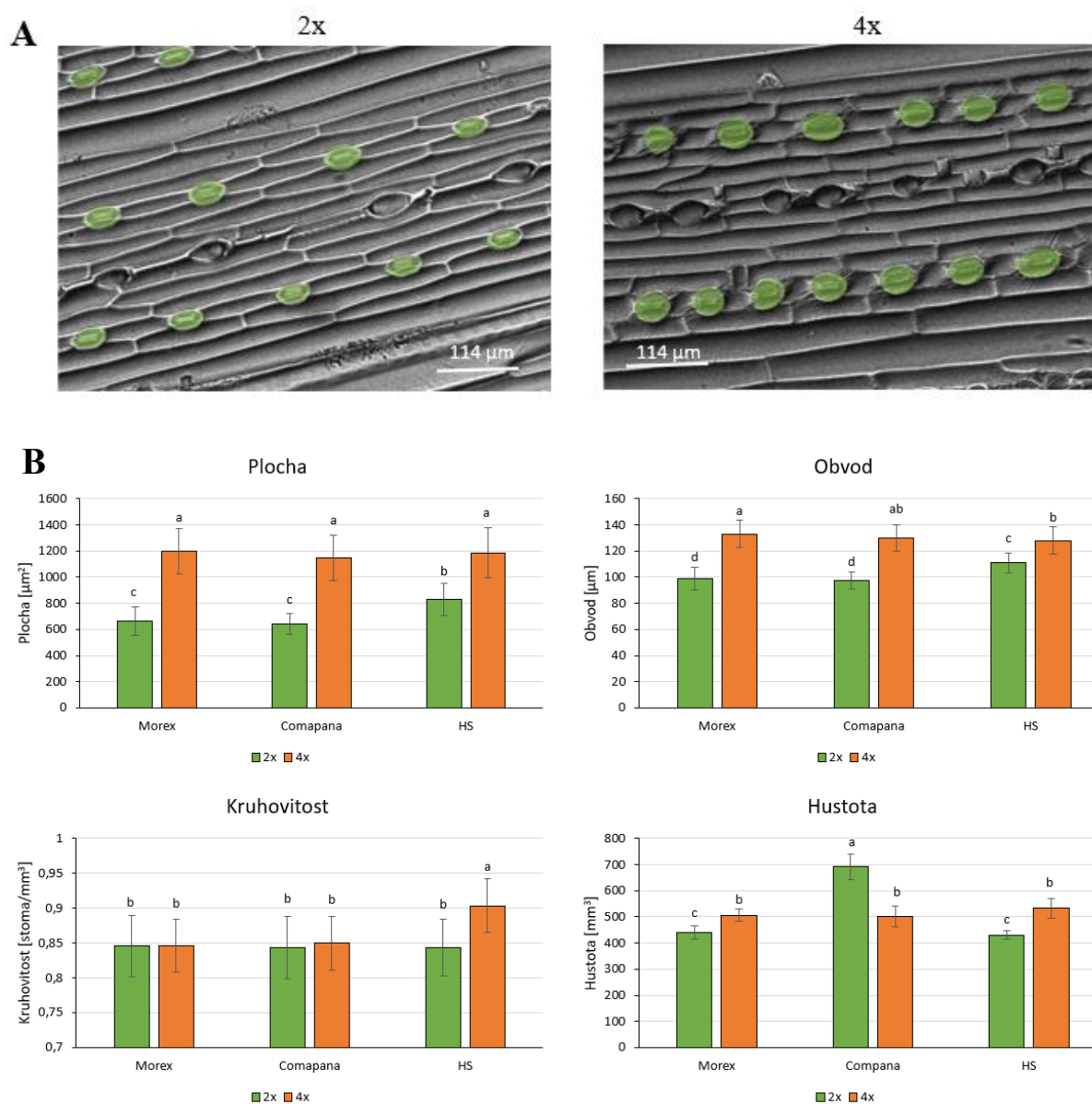


Obrázek 14: Schopnost klíčení tetraploidních semen C2 generace u tří genotypů ječmene. A – Procentuální zastoupení vyklíčených semen. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem). B – Kontrola tetraploidie u rostlin C2 generace s využitím průtokové cytometrie na základě (A). Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) ze 3 biologických replik, každá tvořena 3–8 rostlinami.

5.2.1.1 Hustota a tvar stomatálních znaků

Polyploidizace ovlivňuje velikost a hustotu stomat (Hosseini et al., 2018). Pro doplnění výsledků získaných průtokovou cytometrií byly následně studována stomata a jejich znaky tetraploidních linií (C2) v porovnání s diploidními.

Bylo vypořazováno, že u všech tetraploidních linií byla stomata větší oproti diploidním rostlinám. Například u kultivaru Compana byla plocha stomat $641 \mu\text{m}^2$ a $1150 \mu\text{m}^2$ u diploidní a tetraploidní rostliny v tomto pořadí. Stejný trend byl pozorován u obvodu (Obrázek 15B). Co se týče kruhovitosti stomat, stomata tetraploidních linií kultivarů Morex a Compana byla téměř identická s diploidními liniemi, zatímco kruhovitost tetraploidních linií divokého ječmene byla vyšší jak u diploidních linií divokého ječmene (Obrázek 15B). U tetraploidních linií kultivaru Morex a divokého ječmene byla také pozorována vyšší hustota stomat, konkrétně 507 mm^3 a 532 mm^3 . Nicméně u kultivaru Compana pozorujeme opačnou situaci, kdy diploidní linie (691 mm^3) mají vyšší hustotu stomat na mm^3 jak tetraploidní (502 mm^3 ; Obrázek 15B).

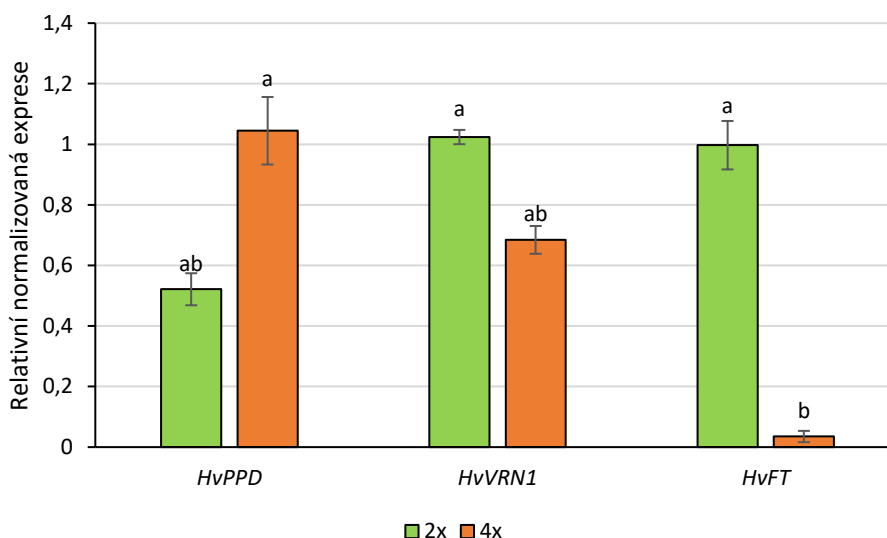


Obrázek 15: Charakterizace stomatálních znaků u diploidních a tetraploidních (C2 generace) rostlin ječmene. A – Reprezentativní snímek vzhledu a velikosti stomat u divokého ječmene. B – Kvantifikace stomatálních znaků. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) z 10 mikroskopických zorných polí. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

5.2.1.2 Porovnání exprese vybraných genů kvetení u diploidních a tetraploidních rostlin

Pro porovnání exprese tří genů ovlivňujících kvetení (*HvPPD*, *HvVRN1*, *HvFT*) u diploidní a tetraploidní linie kultivaru Morex byla provedena RT-qPCR a jako referenční gen byl použit gen *ACTIN*.

Na základě získaných výsledků byla pozorována vyšší exprese genu *HvPPD* u tetraploidní linie o více jak polovinu v porovnání s diploidní linií. U genu *HvVRN1* byla naopak pozorována vyšší exprese u diploidní linie v porovnání s tetraploidní linií. Co se týče genu *HvFT*, tak jeho exprese byla značně vyšší u diploidní linie, zatímco jeho exprese u tetraploidní linie byla minimální (Obrázek 16).



Obrázek 16: Relativní exprese u diploidního a tetraploidního ječmene kultivaru Morex. Různá písmena značí statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem). Hodnoty jsou průměrem ze 3 biologických opakování. Pro normalizaci hodnot byl použit ACTIN gen.

5.2.2 Reproductivní fáze růstu

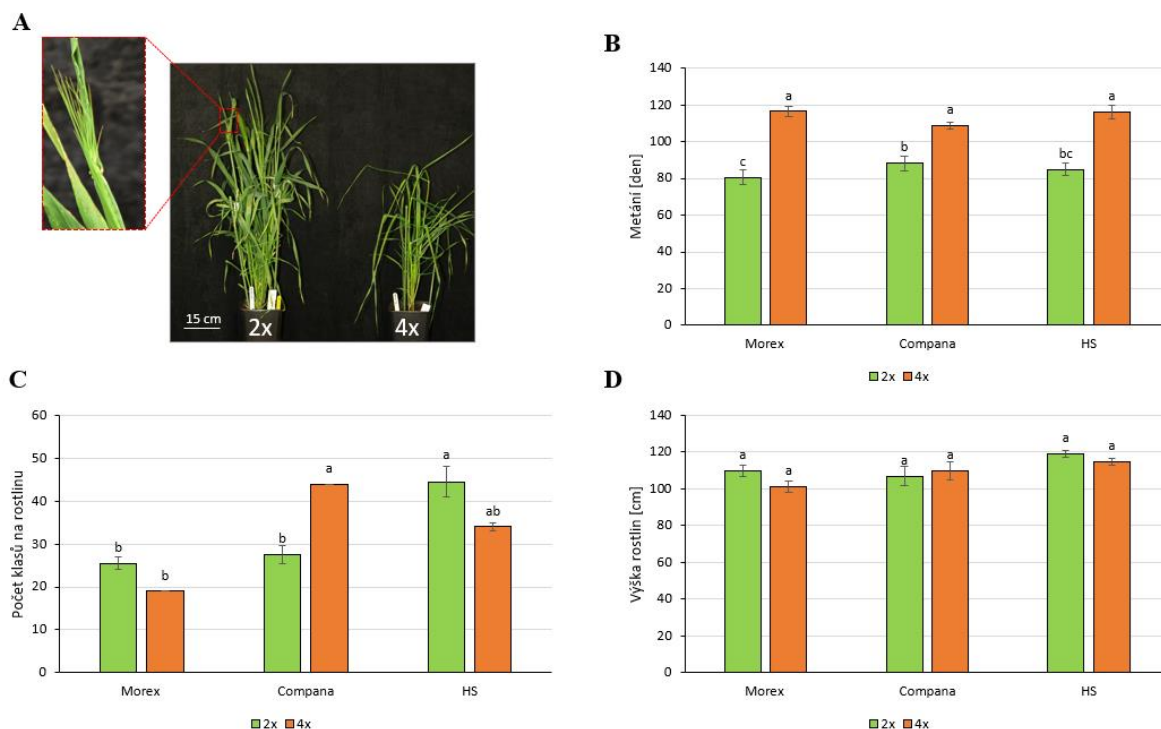
5.2.2.1 Fenotypová analýza vzrostlých rostlin

Následně byla provedena charakterizace vzrostlých tetraploidních linií kultivaru Morex, Compana a divokého ječmene (C2 generace). Jako první byla pozorována fáze růstu zvaná metání – počet dní od klíčení až do doby, kdy jsou viditelné osiny na prvním klasu (Obrázek 17A). Data jsou prezentována na Obrázku 17B.

U všech tetraploidních linií v porovnání s diploidními bylo pozorováno opoždění růstu. Konkrétně tetraploidní linie kultivaru Morex byly opožděny oproti diploidním v průměru o 33 dnů, tetraploidní linie kultivaru Compana v průměru o 20 dnů a tetraploidní linie divokého ječmene v průměru o 29 dnů (Obrázek 17B).

Poté byla zdokumentována výška rostliny a přepočet jednotlivých klasů na rostlinu. Na základě těchto pozorování bylo zjištěno, že tetraploidní linie mají v případě kultivaru Morex a divokého ječmene menší počet klasů na rostlinu oproti diploidním rostlinám (například diploidní divoký ječmen má 45 klasů, zatímco tetraploidní divoký ječmen pouze 34), výjimku tvoří pouze tetraploidní linie kultivaru Compana, kde diploidní linie mají v průměru 28 klasů na rostlinu, zatímco tetraploidní linie mají 44

(Obrázek 17C). Podobná pozorování byla získána v rámci výšky rostlin, kdy bylo zjištěno, že tetraploidní linie jsou o pár centimetrů nižší jak diploidní linie, opět s výjimkou tetraploidní linie Compana, kde byl pozorován vyšší růst rostliny v porovnání s diploidní linií (Obrázek 17D).



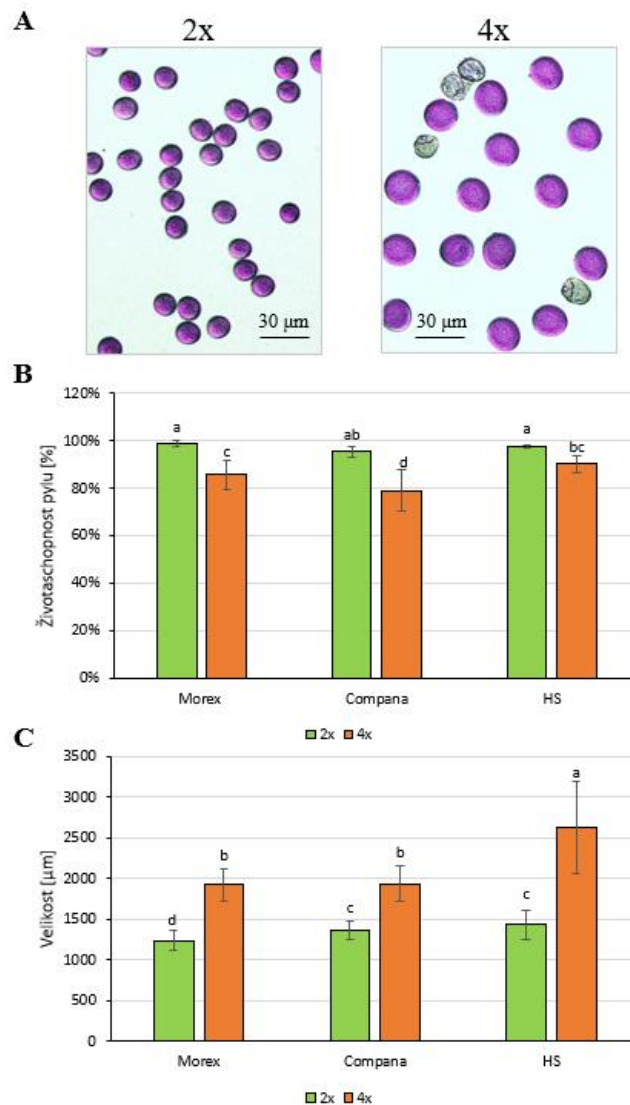
Obrázek 17: Fenotypová analýza diploidního a tetraploidního ječmene v reprodukční fázi růstu. A – Reprezentativní snímek 12 týdnů starých diploidních a tetraploidních rostlin ječmene kultivaru Morex. B – Kvantifikace doby metání představující počet dní od vysazení do doby metání. C – Počet klasů na jednu rostlinu. D – Výška rostliny. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) ze 2 biologických replik, každá tvořena 2–4 rostlinami. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

5.2.2.2 Kontrola životaschopnosti a velikosti pylu

Pro určení životaschopnosti pylu bylo provedeno Alexandrovo barvení, které díky obsahu fuchsinu a malachitové zeleni je schopné odlišit životaschopné a neživotaschopné buňky. Životaschopné se obarví do fialova, jelikož dojde k navázání fuchsinu na protoplast, zatímco neživotaschopné buňky jsou díky přítomnosti malachitové zeleni obarveny do modro-zelena, protože dojde k navázání malachitové zeleně na celulózu v buněčné stěně pylu (Alexander, 1980). Obarvený pyl byl poté pozorován a zdokumentován prostřednictvím světelného mikroskopu (Obrázek 18A). Pro vyhodnocení velikosti pylu byl použit ImageJ a všechna data byla zpracována ve formě grafu viz Obrázek 18B.

Na základě Alexandrova barvení byla pozorována redukce životaschopnosti pylu u všech tetraploidních linií (C2 generace) v porovnání s diploidními rostlinami. Nejvyšší redukce byla pozorována v případě kultivaru Compana, a to o 19 %, o trochu menší byla pozorována v případě kultivaru Morex, a to o 14 %. Kdežto nejmenší redukce byla pozorována u divokého ječmene, konkrétně o 10 % (Obrázek 18B).

Co se týče velikosti pylových zrn, velikost u pylových zrn všech tetraploidních linií byla naměřena vyšší jak u diploidních linií viz Obrázek 18C. To je dalším důkazem potvrzujícím úspěšnou tetraploidizaci.

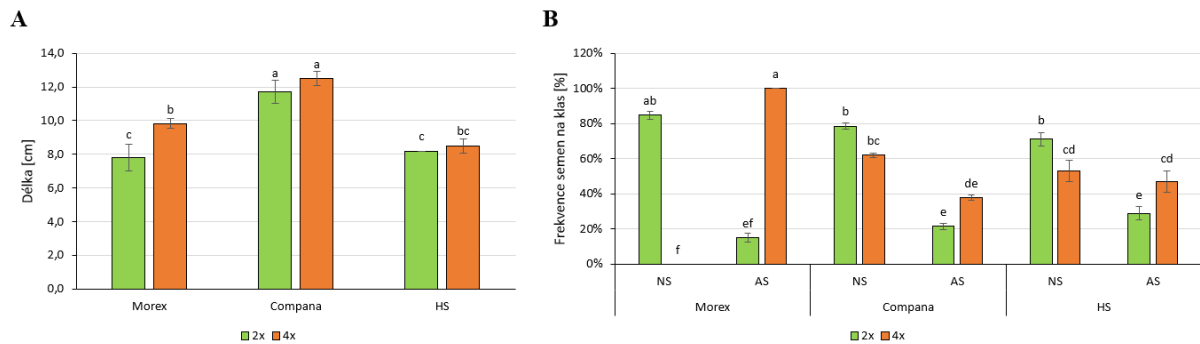


Obrázek 18: Životaschopnost pylu u diploidního a tetraploidního (C2 generace). A – Reprezentativní snímek pylových zrn izolovaných z diploidních a tetraploidních HS rostlin barvených Alexandrovým barvivem. Fialová – viabilní; zeleno-modrá – neviabilní pyl. B – Kvantifikace životaschopnosti pylu. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) z 10 mikroskopických zorných polí. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem). C – Velikost individuálních životaschopných pylových zrn. Data byla získána a vyhodnocena stejně jako (B).

5.2.2.3 Fenotypová analýza suchých klasů

Pro bližší charakterizaci tetraploidních linií byla změřena délka jednotlivých klasů a také frekvence počtu semen na jeden klas. Na základě těchto pozorování byla zjištěno, že délka klasu u všech tetraploidních linií v porovnání s diploidními byla delší (Obrázek 19A). Zároveň bylo pozorováno, že jednotlivé klasy diploidních linií mají okolo 80 % normálně se vyvíjejících se semen, zbytek tvoří

abortovaná vajíčka (vajíčka, která se nevyvinula v semeno). Zatímco v případě tetraploidní linie Morex nebylo pozorováno jediné normálně se vyvíjející semeno. U kultivaru Compana a divokého ječmene byl pozorován vznik okolo 60 % a 50 % normálně se vyvíjejících semen (Obrázek 19B).

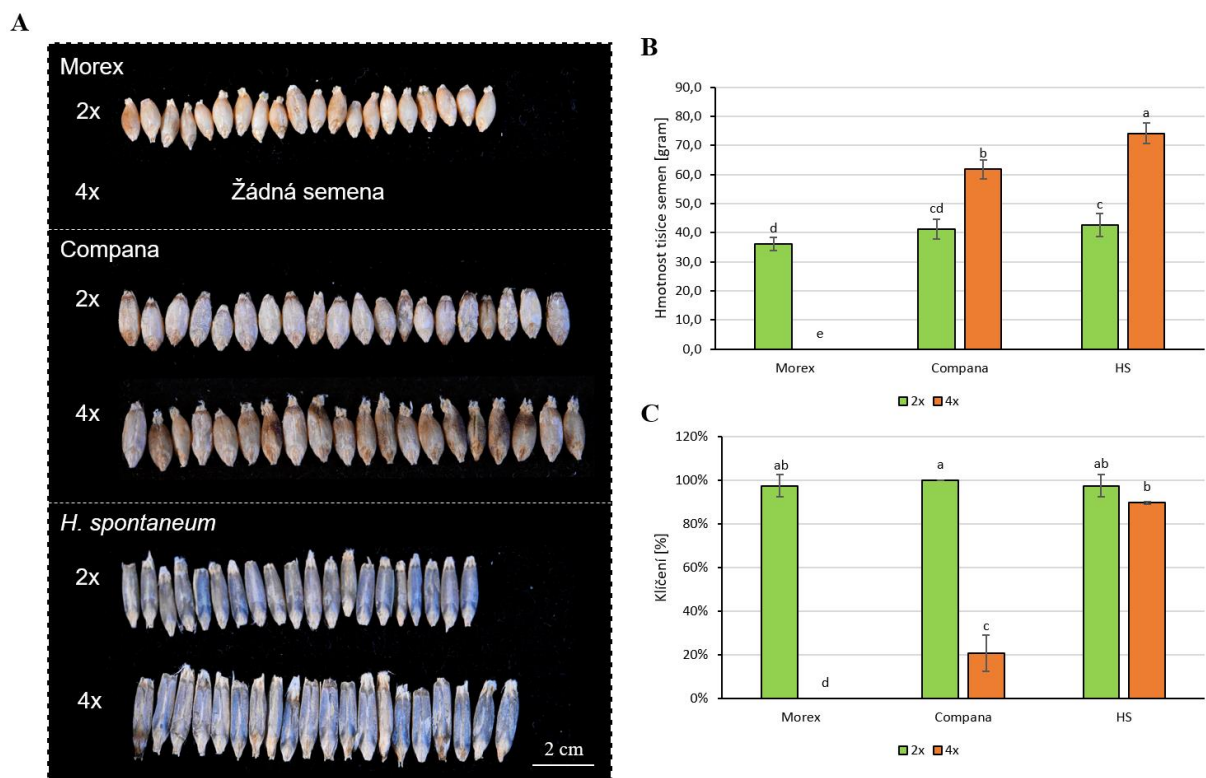


Obrázek 19: Charakterizace klasu a semen diploidního a tetraploidního ječmene. A – Délka klasu. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) ze 3 biologických replik, každá tvořena 10 klasy. B – Frekvence semen na klas. NS – normální semeno; AS – abnormální semeno. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) ze 10–25 hodnocených klasů. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p < 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

5.2.2.4 Charakterizace semen tetraploidních a diploidních linií

Pro charakterizaci semen (C3 generace) tetraploidních linií a jejich porovnání s diploidními byla semena zdokumentována prostřednictvím stereoskopického mikroskopu a zvážena pomocí analytických vah. Získaná váha byla přepočtena na hmotnost tisíce semen. Ze získanými semeny byl následně proveden test klíčení.

U kultivaru Morex byla pozorována absence tvorby semen u tetraploidní linie (Obrázek 20A). Zatímco u kultivaru Compana a divokého ječmene byla pozorována tvorba semen u tetraploidních linií, jejich hmotnost byla však v porovnání se semeny diploidních linií těžší. Konkrétně u tetraploidní linie kultivaru Compana se hmotnost zvýšila asi 1,5krát ve srovnání s diploidní linií. U divokého ječmene byl tento nárůst téměř dvojnásobný (Obrázek 20AB). Nicméně po provedení testu klíčení vyklíčilo pouze 20 % semen tetraploidní linie Compana, zatímco semena tetraploidní linie divokého ječmene měla téměř 100% úspěšnost klíčení (Obrázek 20C).



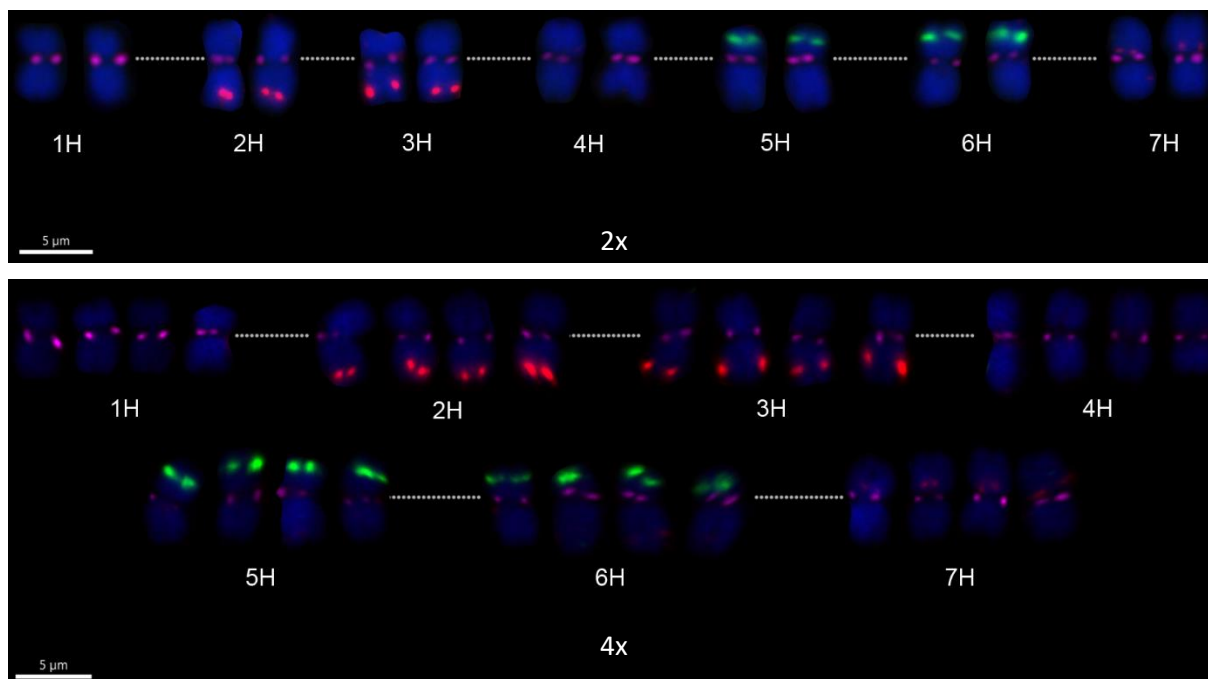
Obrázek 20: Charakterizace diploidních a tetraploidních (C3 generace) semen u ječmene. A – Reprezentativní snímek znázorňující fenotyp oloupaných (nahých) semen. B – Váha semen. C – Schopnost klíčení semen. Hodnoty (B a C) jsou průměry (\pm SD) z 6 hodnocených rostlin. Různá písmena (B a C) značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

5.2.2.5 Analýza počtu chromozomů

Před samotným interploidním křížením byla provedena kontrola počtu chromozomů u vyselektované stabilní tetraploidní linie divokého ječmene (C3 generace) pro kontrolu potenciálních aberací a nestability. Pro porovnání a kontrolu byly pozorovány metafázové chromozomy také u diploidní linie divokého ječmene.

Za tímto účelem byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace, kdy chromozomy byly označeny *CEREBA*-centromerickou sondou a *45S* a *5S rDNA* sondami. K experimentu byly použity chromozomy kořenového apikálního meristému naklíčených C3 semen. Chromozomy byly na základě vzniklých signálů seřazeny a byl vytvořen karyotyp pro diploidní a tetraploidní linii divokého ječmene podle literatury (Kapusi et al., 2012; Nowicka et al., 2023).

Tato metoda potvrdila podle předpokladu přítomnost vždy zdvojnásobené množství párů chromozomů u tetraploidní linie, tedy místo jednoho páru, páry dva (Obrázek 21).



Obrázek 21: Potvrzení počtu chromozomů u diploidního a tetraploidního (C3 generace) divokého ječmene na metafázových chromozomech kořenového apikálního meristému. Snímky znázorňují karyotypy zpárované na základě lokace *CEREBAC*-centromerické (růžová), *45S* (zelená) a *5S* (červená) *rDNA* sondy s využitím fluorescenční in situ hybridizace. DNA obarvená DAPI (modrá).

5.3 Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen

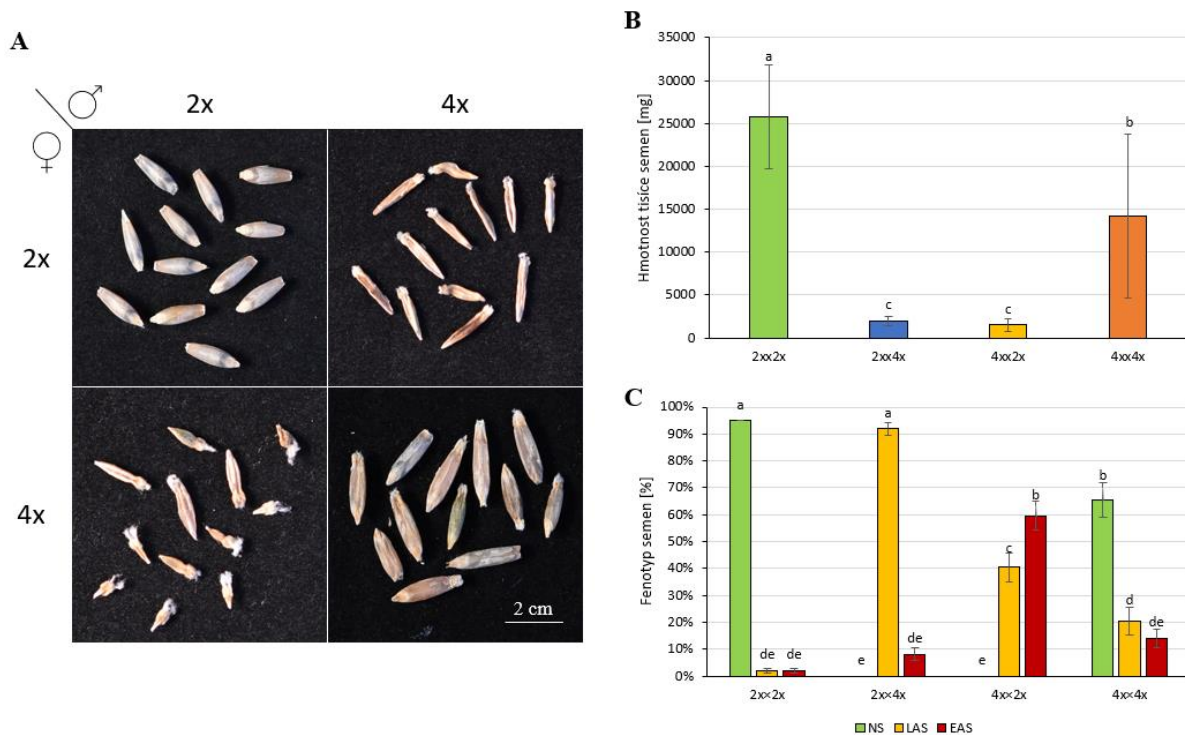
Za účelem studia parentálního konfliktu na vývoj semen u ječmene byla provedena interploidní křížení mezi diploidními a tetraploidními (C3 generace) liniemi divokého ječmene. Konkrétně bylo provedeno křížení ve čtyřech kombinacích: diploidního otce s diploidní matkou ($2x \times 2x$), diploidního otce s tetraploidní matkou ($2x \times 4x$), tetraploidního otce s diploidní matkou ($4x \times 2x$) a tetraploidního otce s tetraploidní matkou ($4x \times 4x$; Obrázek 22A). Vzniklá semena z jednotlivých křížení byla poté zvažena na analytických váhách a přepočítána na hmotnost tisíce semen.

Nejvyšší hmotnost byla pozorována u kontrolních křížení $2x \times 2x$ (~ 25 gramů), o něco nižší byla pozorována u $4x \times 4x$ (~ 15 gramů; generace C4). Naopak u semen z křížení rodičů s různou ploidií ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) byla hmotnost tisíce semen výrazně nižší, okolo 2,5 gramů (Obrázek 22B).

Rozdíl v hmotnostech může být vysvětlen různým fenotypem semen získaných křížením. Semena byla rozdělena do tří fenotypů: NS, LAS a EAS. Určení těchto fenotypů bylo provedeno na základě literatury (Nowicka et al., 2021; Yang et al., 2021).

V případě $2x \times 2x$ bylo pozorováno 95% zastoupení NS a minimální zastoupení LAS a EAS. Zatímco v případě $4x \times 4x$ je zastoupení EAS a LAS vyšší jak u $2x \times 2x$, avšak stále dochází k převážnému zastoupení NS (65 %). Kdežto u křížení rodičů s různou ploidií ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) nebylo pozorováno žádné normálně se vyvíjející semeno. V těchto případech bylo pozorováno pouze zastoupení EAS

a LAS. Konkrétně v případě křížení $2x \times 4x$ bylo pozorováno výrazně vyšší zastoupení LAS (92 %), naopak u křížení $4x \times 2x$ vyšší zastoupení EAS (60 %; Obrázek 22C).

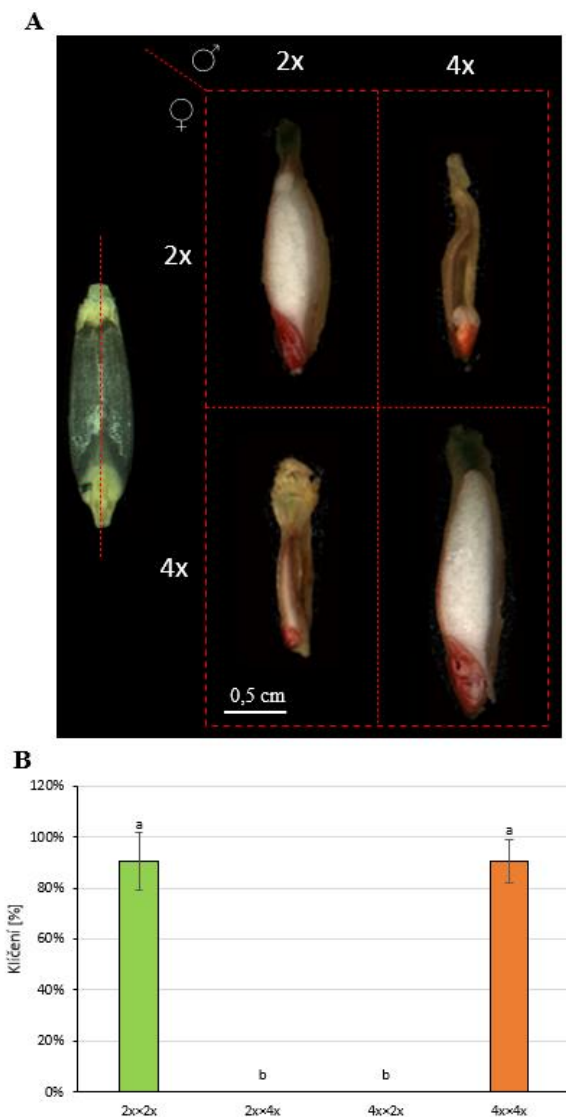


Obrázek 22: Fenotypové defekty semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene. A – Reprezentativní snímek znázorňující fenotyp semen. B – Váha semen pro daná křížení. Hodnoty jsou průměry (\pm SD) z celkově 20 klasů. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem). C – Frekvence tří fenotypů semene; NS – normální semeno; LAS – late-aborted seed (pozdě-abortované semeno); EAS – early-aborted seed (brzy-abortované semeno). Data byla získána ze stejných klasů jako v (B). Statistika byla provedena stejným způsobem jako v (B).

5.3.1 Test životaschopnosti buněk barvením tetrazoliem

Z důvodu neschopnosti interploidních křížení ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$) vytvářet NS, byl proveden test životaschopnosti buněk embrya, a to prostřednictvím barvení tetrazoliem. Viabilní embryo bylo obarveno červeně, zatímco neviabilní embryo zůstalo neobarveno. Na základě tohoto testu bylo pozorováno u všech 4 typů křížení ($2x \times 2x$; $2x \times 4x$; $4x \times 4x$; $4x \times 2x$) životaschopné embryo viz Obrázek 23A.

Proto byl poté proveden navíc test klíčení, kde však došlo pouze k vyklíčení semen křížení $2x \times 2x$ a $4x \times 4x$ a žádných semen interploidních křížení ($2x \times 4x$; $4x \times 2x$), i přes pozitivitu viability embrya barvením tetrazoliem (Obrázek 23B).

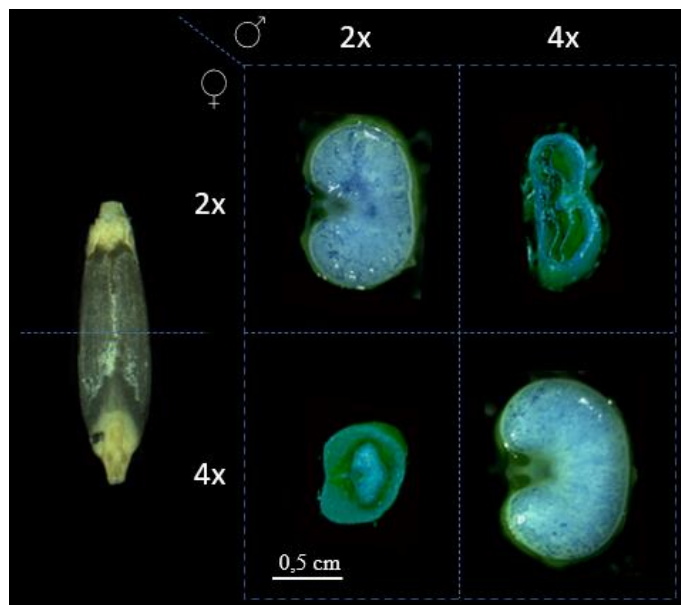


Obrázek 23: Testování životaschopnosti a schopnosti klíčit semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene. A – Podélné řezy znázorňující životaschopnost buněk embrya barvením tetrazoliem červeně. B – Kontrola schopnosti klíčení semen. Hodnoty jsou průměrem (\pm SD) ze 3 biologických replik, každá tvořena 8–10 semeny. Různá písmena značí významné rozdíly v hodnotách ($p \leq 0,05$; jednosměrná ANOVA, následovaná Tukeyho *post hoc* testem).

5.3.2 Test buněčné smrti barvením Evansovou modří

Na základě výše získaných výsledků byl následně proveden také test buněčné smrti endospermu, a to prostřednictvím barvení Evansovou modří. Princip barvení je opačný oproti barvení tetrazoliem. K obarvení modře dojde pouze u neviabilního endospermu, zatímco viabilní endosperm zůstane neobarven. V případě normálně se vyvíjejících suchých semen by měl být celý endosperm obarven modře (Nowicka et al., 2021). Na základě tohoto barvení bylo pozorováno u křížení $2x \times 2x$ a $4x \times 4x$, že endosperm vyplnil celý prostor semene. V případě křížení diploidní matky a tetraploidního otce byla pozorována absence endospermu v hybridních semenech, zatímco u křížení tetraploidní matky

s diploidním otcem endosperm vyplnil celý prostor malého semene. Nicméně u tří typů křížení byl endosperm obarven modře (Obrázek 24).



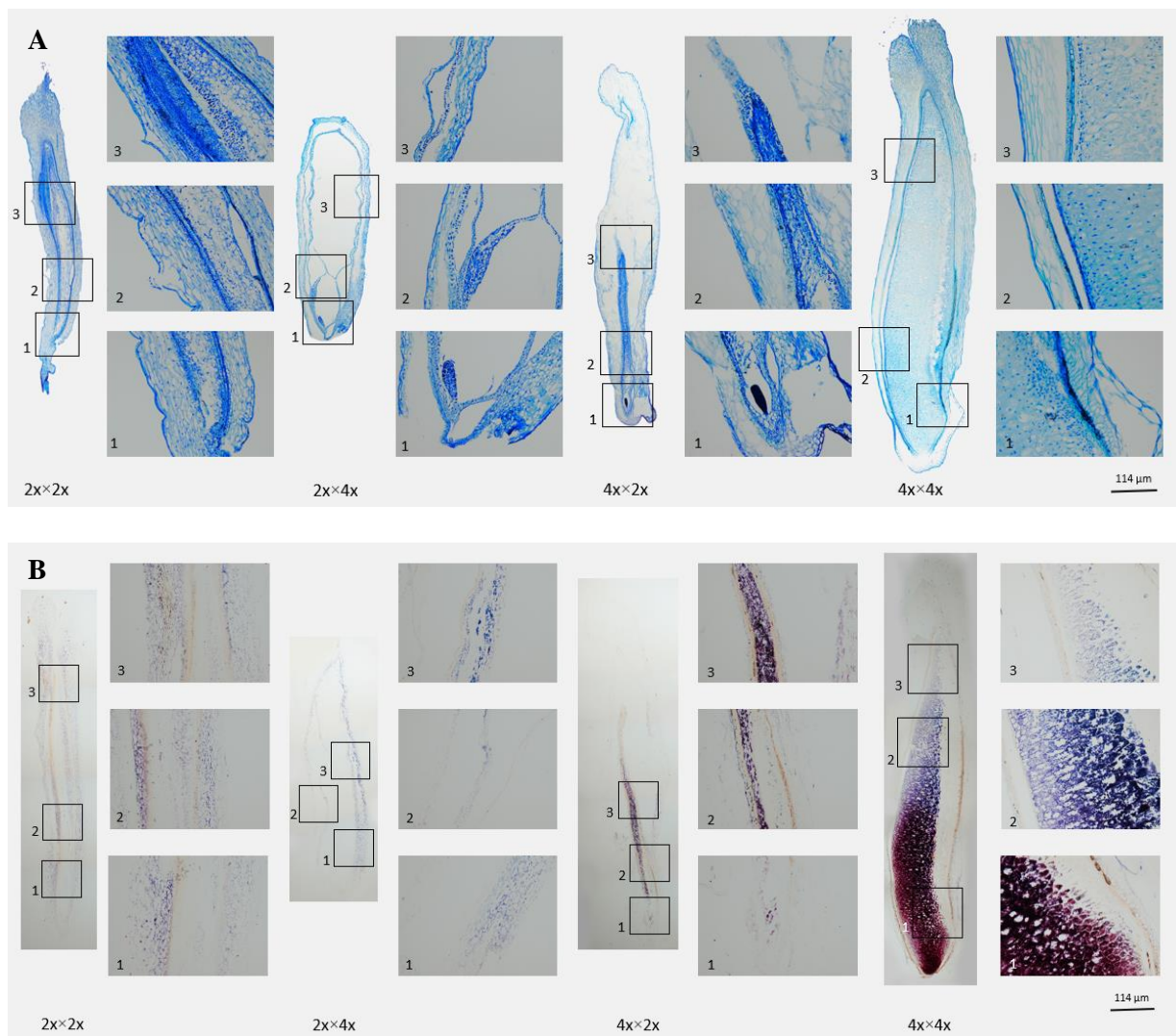
Obrázek 24: Přítomnost endospermu v semenech získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene. Příčné řezy obarveny Evansovou modří barvicí neživotaschopné buňky endospermu modře.

5.3.3 Histologická analýza

Z toho důvodu byla provedena detailní analýza endospermu u 16 DAP starých semen tvorbou řezů na mikrotomu a jejich následným barvením. Celkově byla provedena dvě barvení. Barvení Toluidinovou modří pro obarvení chromatinu a buněčných stěn a barvení Lugolovým roztokem pro obarvení škrobu (Ishikawa et al., 2011).

Plná celularizace endospermu byla pozorována u kontrolních křížení ($2x \times 2x$; $4x \times 4x$). U křížení diploidní matky s tetraploidním otcem ($2x \times 4x$) a tetraploidní matky s diploidním otcem ($4x \times 2x$) byla pozorována přítomnost malého embrya. Rozdíl byl pozorován v přítomnosti a době celularizace endospermu. Jelikož u $2x \times 4x$ byla pozorována přítomnost malého množství endospermu a celý prostor semene byl vyplněn centrální vakuolou, která naznačuje, že zde dochází k opožděné celularizaci. V případě $4x \times 2x$ došlo k precizní celularizaci, jelikož centrální vakuola byla již nahrazena buňkami endospermu (Obrázek 25A).

Pro vyhodnocení vývojových přechodů endospermu po celularizaci, bylo zkoumáno hromadění zásobních látek, konkrétně škrobu, prostřednictvím Lugolova barvení. U kontrolních křížení ($2x \times 2x$; $4x \times 4x$) a interploidního křížení $4x \times 2x$ bylo pozorováno hromadění škrobu v celém endospermu, nejhustější v blízkosti embrya, zatímco u křížení $2x \times 4x$ byl škrob pozorován pouze v osemeni (Obrázek 25B).



Obrázek 25: Mikrotomové řezy 16 DAP semen získaných vzájemným interploidním křížením mezi diploidními a tetraploidními rostlinami divokého ječmene. A – Řezy obarvené Toluidinovou modří pro vizualizaci vývoje embrya a endospermu. Poznámka: Embryo není přítomno na obrázcích zobrazujících semena získaná kontrolním křížením (2x × 2x; 4x × 4x). B – Řezy obarvené Lugolovým roztokem pro detekci škrobových zrn. Snímky (A a B) ukazují detaily vývoje embrya a endospermu.

6 Diskuse

6.1 Tvorba tetraploidního ječmene

V současné době běžně a nejvíce používaným způsobem, jak vytvořit tetraploidní linie u rostlin je za pomoci mitotického jedu kolchicinu, a to většinou u rostlin pěstovaných klasicky v půdě (Sourour et al., 2014). V této práci jsme využili stejného způsobu přípravy tetraploidních linií. Nicméně pro urychlení růstu rostlin jsme použili rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách. *In vitro* podmínky nabízí řadu výhod, zejména není potřeba zdaleka tolik místa pro pěstování rostlin v *in vitro* podmínkách jak u rostlin pěstovaných v půdě, dalším plus je, že lze pěstovat více rostlin na jednom místě, tedy na jednom médiu a také to znamená určité výhody pro následující kroky přípravy tetraploidních linií, a to z pohledu čištění kořenů od hlíny. Tento způsob přípravy tetraploidních linií nebyl doposud proveden u obilnin a tento nápad s pěstováním rostlin v *in vitro* podmínkách pro následné ošetření kolchicinem přišlo na základě článku o *Arabidopsis*, kde je běžnou praxí pěstování rostlin v *in vitro* podmínkách (Yang et al., 2021).

V tomto experimentu jsme pro přípravu tetraploidních linií ječmene použili kultivar Morex, kultivar Compana a divoký ječmen. Všechny tři genotypy ječmene byly pěstovány jak v půdě, tak v *in vitro* podmínkách, nicméně se ukázalo, že rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách, které byly následně vystaveny působení kolchicinu, měly nižší poměr přežití, jak u rostlin pěstovaných v půdě. Důvodem může být, že samotné *in vitro* podmínky představují pro rostlinu určitý stres, a poté, kdy je rostlina vystavena dalšímu stresu (působení kolchicinem), tak rostlina není schopna tyto podmínky přežít, zatímco podmínky pro rostliny pěstované v půdě napodobují přirozené prostředí (Yildiz, 2011).

Avšak pokud se zaměříme na účinnost tetraploidizace u jednotlivých genotypů, tak si lze povšimnout, že kultivary Morex a Compana mají vyšší účinnost tetraploidizace, jinými slovy více rostlin je čistě tetraploidních u rostlin pěstovaných v *in vitro* podmínkách. Kdežto divoký ječmen má vyšší účinnost tetraploidizace v případě rostlin pěstovaných v půdě. Tento úkaz by se dal vysvětlit tím, že genotypy Morex a Compana jsou kultivary, tedy uměle vypěstované rostliny, dalo by se říci, že jsou na *in vitro* podmínky lépe připraveny, zatímco pro divoký ječmen *in vitro* podmínky představují určitý typ stresu, je tak pro něj jednodušší vytvořit úspěšné tetraploidní linie u rostlin pěstovaných jemu ve více připomínajícím přirozených podmínkách, tedy v půdě (Biagioli et al., 2006).

I přesto, že se *in vitro* podmínky pro kultivary Morex, Compana a divoký ječmen zdají být horšími, zároveň v případě kultivarů Morex a Compana se ukazuje, že přes nižší procento přežití, je u nich právě za těchto podmínek tetraploidizace nejúčinnější.

6.2 Charakterizace a selekce stabilní tetraploidní linie

Tetraploidizace, celkově zdvojení celého genomu, tedy zvyšování ploidie u rostlin hrála v rámci jejich evoluce velký význam. Ploidizace hrála důležitou roli při speciaci rostlin a domestikaci plodin. Mnoho důležitých plodin jako je pšenice, bavlna a řepka olejná jsou polyploidy (Song a Chen, 2015). Umělá tetraploidizace i dnes hraje významnou roli při šlechtění a zabezpečení zemědělské výroby, jelikož vlivem tetraploidizace dochází ke zvětšování jednotlivých buněk, ale i celkové velikosti rostliny z důvodu zvýšení obsahu DNA (Robinson et al., 2018; Satpathy et al., 2021).

Nicméně se ukazuje, že u tetraploidních linií může také docházet k jakési nestabilitě, kterou nazýváme „genomový šok“. Zdvojování chromozomů vyvolává řadu genetických a epigenetických modifikací, které jsou výsledkem juxtapozice a interakce odlišných homeologních regulačních sítí, což vede k novým cis- a trans-působícím účinkům na genovou expresi (Aleza et al., 2011; Doyle a Coate, 2019). Indukovaná vícenásobná ploidie může navíc také ovlivňovat vnitřní homeostázu buňky, což může vést k meiotické nestabilitě, špatné sexuální reprodukci a dalším epigenetickým změnám v rostlinách (Gantait a Mukherjee, 2021).

Tuto nestabilitu jsme pozorovali při testu klíčení u C2 generace semen tetraploidních linií, kdy u kultivarů Morex a Compana došlo k redukci schopnosti klíčení až na 20 %, nicméně tento problém nebyl pozorován u divokého ječmene, kde úspěšnost klíčení dosahovala 90 %. Můžeme tak říct, že se jedná pravděpodobně o genotypově závislou odpověď na tetraploidizaci. Důvodem tohoto jevu může být, že divoký ječmen je zdrojem řady genů rezistentních vůči biotickým a abiotickým stresům a dokáže se tak lépe vyrovnat se stresy, kterou tetraploidizace může představovat, narozdíl od kultivarů Morex a Compana, které mohly tuto schopnost ztratit v průběhu křížení a domestikace (Fetch et al., 2003).

Součástí této práce bylo také potvrzení výsledků tetraploidizace. Z tohoto důvodu jsme provedli experiment sledující stomatální znaky rostlin u generace C2, jelikož tento způsob potvrzení tetraploidizace, konkrétně jejího efektu na změnu morfologie, byl již několikrát proveden (Leal-Bertioli et al., 2012; Zhang a Gao, 2020). Tento typ experimentu se navíc provádí jako alternativa k měření ploidie pomocí průtokové cytometrie. Tyto studie se shodují, že velikost stomat se vlivem tetraploidizace zvětšuje oproti diploidním rostlinám, čímž dochází k snižování jejich hustoty oproti diploidním liniím, kdy jsou stomata menší a víc se jich tak vejde na menší plochu (Zhang a Gao, 2020).

Na základě tohoto experimentu sledujícího stomatální znaky, bylo potvrzeno, že tetraploidizace opravdu zvětšuje velikost stomat u tetraploidních rostlin, což mělo v případě divokého ječmene za následek lehké změny tvaru, jinými slovy tetraploidní stomata jsou kruhovitější oproti diploidním. Nicméně tuto změnu nepozorujeme u kultivarů Morex a Compana, může se tak jednat o genotypově daný znak. Co se týče změny hustoty stomat, opět se může jednat o genotypově daný znak, jelikož v případě kultivaru Compana došlo ke snížení hustoty u tetraploidní linie stejně jako v člácích Leal-Bertioli et al., 2012;

Zhang a Gao, 2020, zatímco u kultivaru Morex a divokého ječmene pozorujeme přesně opačný efekt. V budoucnu by tento experiment by mohl být doplněn o počítání počtu chloroplastů a studium účinnosti fotosyntetického systému.

Data prezentovaná v této práci naznačují, že tetraploidizace může měnit nejen morfologii, ale také fyziologii rostlin. Proto jsme se rozhodli porovnat expresi genů kvetení. Vybrali jsme tři důležité geny ovlivňující kvetení – *HvPPD*, *HvVRN1* a *HvFT* – a sledovali jsme jejich expresi u kultivaru Morex. *De novo* tetraploidizace (navozená kolchicinem) způsobila u Morexu znásobení celého genomu. Z tohoto důvodu jsme předpokládali i celkové zvýšení exprese výše uvedených genů. Analýza exprese genů ukázala, že vyšší exprese nastala pouze u genu *HvPPD*, zatímco geny *HvVRN1* a *HvFT* měly nižší expresi ve srovnání s diploidním Morexem. Tento výsledek může být dán tím, že během tetraploidizace dochází k interakci dvou kopií genomů, které následně mohou vyvolávat různé genetické a epigenetické změny. Tyto změny mohou vést k reorganizaci genomu, změně regulačních mechanismů a expresi genů, které pomáhají polyploidním organismům se lépe adaptovat na okolní prostředí (Song a Chen, 2015). Tato data ukazují, že by bylo zajímavé provést studium většího množství genů, například pomocí sekvenování nové generace (sekvenování RNA).

Dále pro důkladnější charakterizaci rostlin tetraploidních linií byly sledovány zejména fenotypové znaky. Jako první jsme se zaměřili na růst rostlin, konkrétně na fázi zvanou metání (Alqudah a Schnurbusch, 2017), kde se ukázalo, že tetraploidní rostliny potřebují více času v průměru 27 dnů k tomu, aby se dostali do této fáze metání. Tato informace byla velmi důležitá z hlediska synchronizace materiálu pro interploidní křížení. Navíc jsme vypožorovali, že stejně staré tetraploidní rostliny jsou menší oproti diploidním a mají nižší počet klasů na rostlinu. Tento jev byl zaznamenán u mnoho uměle generovaných tetraploidů, ale otázka, jak duplikace celého genomu ovlivňuje růst a vývoj rostlin, zůstává nezodpovězena (Corneillie et al., 2019). Údaje z jiných rostlinných druhů odhalily, že důvodem může být počet buněčných dělení autotetraploidů (Comai, 2005). Duplikace genomu vyžaduje dvojnásobné množství nukleotidů pro replikaci genomu před buněčným dělením. Je možné, že existuje negativní korelace mezi obsahem DNA a počtem buněčných dělení, což může mít za následek větší energetické nároky u tetraploidních rostlin. Tento fenomén byl již dříve nazván jako „syndrom vysoké ploidie“ (Tsukaya, 2008).

Výjimku tvoří kultivar Compana, který i přes opožděnou dobu metání zhruba o 20 dnů je vyšší a má vyšší počet klasů na rostlinu v porovnání s diploidní rostlinou. Opět může jít o genotypově daný znak. Bylo by zajímavé se tomuto tématu v budoucnu věnovat podrobněji.

Dále jsme se zaměřili na kontrolu viability pylu jednotlivých genotypů prostřednictvím Alexandrova barvení. Zde se výsledky shodují u všech tří genotypů tetraploidních linií dochází k redukcí životaschopnosti pylu, tato redukce životaschopnosti není nijak zásadní, jelikož se pohybuje v rámci 10–20 %. Nicméně i u pylových zrna pozorujeme vliv tetraploidizace, jelikož pylová zrna tetraploidních

linií všech genotypů jsou větší oproti pylovým zrnům diploidních linií. Stejné trendy byly pozorovány i u *Arabidopsis* (Yang et al., 2021).

Pro potvrzení stability tetraploidních linií byla studována semena generace C3. K našemu velkému překvapení tetraploidní linie kultivaru Morex neprodukovala žádná semena. Jelikož bylo prokázáno, že pylová zrna tetraploidní linie kultivaru Morex jsou životaschopná, může se jednat o problém vzniklý při samičí meióze (Evans a Rahman, 1989; Mason a Pires, 2014). Do budoucna by tak bylo dobré se zaměřit právě na studium samičí meiózy.

Dalším překvapivým zjištěním bylo u kultivaru Compana, který i přesto, že jeho tetraploidní linie vyprodukovali semena, tak tato semena měla úspěšnost klíčení pouze něco okolo 20 %. Důvod není jasný, můžeme vidět, že semena tetraploidních linií mají zvláštní barvu v porovnání se semeny diploidní linie, do budoucna by tak stálo za zjištění důvod jejich nízké schopnosti klíčení.

Na základě všech výše uvedených experimentů se jako nejlepší kandidát pro finální fázi této práce, kterou je samotné interploidní křížení ukazuje být divoký ječmen, kde pozorujeme produkci semen, tato semena tetraploidní linie divokého ječmene mají vyšší výnos oproti semenům diploidní linie, a co je důležité dosahují téměř 100% schopnosti klíčení.

Téměř všichni autotetraploidi produkují aneuploidní potomstvo kvůli nepravidelnostem v meióze (Doyle, 1986). Z tohoto důvodu jsme na závěr provedli poslední kontrolu stability této tetraploidní linie divokého ječmene. Cílem této analýzy byla kontrola počtu chromozomů za pomoci fluorescenční *in situ* hybridizace. Ukázalo se podle předpokladů, že u tetraploidní linie došlo k znásobení chromozomů z původních 14 chromozomů, které pozorujeme u diploidní linie na 28 chromozomů. Nepozorujeme zde žádné aberace, lze tak tuto tetraploidní linii divokého ječmene považovat za stabilní a lze ji použít ve finální fázi této práce, kterou je interploidní křížení.

6.3 Interploidní křížení a charakterizace hybridních semen

Křížení rodičů s různou ploidií může vést k tzv. parentálnímu konfliktu, který představuje jakousi válku mezi genomy otce a matky. Zatímco matka usiluje o rovnocenný vývoj všech potomků na úkor jejich velikost, zájmem otce je co největší a nejsilnější potomstvo (Pires, 2014; Kinoshita, 2018).

Pro potvrzení vlivu parentálního konfliktu jsme provedli křížení ve čtyřech kombinacích: diploidního otce s diploidní matkou ($2x \times 2x$), diploidního otce s tetraploidní matkou ($2x \times 4x$), tetraploidního otce s diploidní matkou ($4x \times 2x$) a tetraploidního otce s tetraploidní matkou ($4x \times 4x$).

Jednotlivá semena ze všech křížení byla následně zvažena na jejímž základě bylo vypořazováno, že semena z interploidních křížení ($2x \times 4x$ a $4x \times 2x$) byly značně lehčí v porovnání se semeny kontrolních křížení. Vypořazovali jsme, že je to dáno z důvodu různých fenotypů semen, jinými slovy z důvodu předčasného ukončení vývoje těchto semen, což vedlo následně k abortu. Rozdělili jsme tak tyto semena

do 3 kategorií NS, LAS a EAS na základě doby, kdy došlo k jejich aborci v rámci DAP podle článku Nowicka et al., 2021. Právě u těchto interploidních křížení nebylo pozorováno žádné normálně se vyvíjející semeno, kdežto u kontrolních křížení tento fenotyp semen převažoval.

Právě z důvodu neschopnosti interploidních kříženců tvořit normální semena byl proveden test životaschopnosti buněk embrya, a to barvením tetrazoliem. Princip tohoto barvení je založen na schopnosti živých buněk přeměňovat bezbarvou látku 2,3,5-trifenylnitrotetrazolium chloridu na barevný produkt ve formě červeného nerozpustného derivátu tetrazolia díky aktivním dehydrogenázám (Grzybowski et al., 2012).

Překvapivě všechna embrya ze všech křížení včetně interploidních byla na základě tohoto testu pozorována jako viabilní. Pro potvrzení jsme provedli test klíčení, nicméně se ukázalo, že přestože semena z interploidních křížení mají viabilní embrya, tak nejsou schopny klíčení, což může poukazovat na možné defekty při vývoji endospermu. Tato neschopnost embrya vyklíčit se nazývá triploidní blok a je způsobena poruchou endospermu (Köhler et al., 2009). Za účelem potvrzení tohoto tvrzení by do budoucna bylo možné provést preparaci embrya a ponechat jej klíčit na živiny obohaceném médiu simulující funkční endosperm a sledovat, zda v takovémto případě dojde k vyklíčení embrya (Ishikawa et al., 2011; Sekine et al., 2013).

Dále jsme se soustředili na pozorování vývoje endospermu. Jako první jsme provedli barvení semen Evansovou modří. Princip tohoto barvení je založen na tom, že buňky, které jsou mrtvé nejsou schopny udržet integritu membrány a vyloučit barvivo, zůstávají tak obarveny modře (Young et Gallie, 1999). V případě semene ječmene je touto mrtvou tkání endosperm (Nowicka et al., 2021). Bylo pozorováno, že u všech křížení jsou buňky endospermu neživotaschopné, nicméně u křížení diploidní matka a tetraploidní otec byla pozorována absence endospermu. To může být způsobeno pravděpodobně z důvodu opožděné celularizace. Stejně výsledky byly také pozorovány u kukuřice a rýže (Pennington et al., 2008; Sekine et al., 2013).

Pro potvrzení tohoto tvrzení jsme využili tvorby řezů za pomoci mikrotomu a jejich následného barvení. Celkově byla provedena dvě barvení, a to barvení Toluidinovou modří a Lugolovým roztokem. Za pomoci barvení Toluidinovou modří bylo odhaleno, že v případě křížení diploidní matky s tetraploidním otcem ($2x \times 4x$) dochází k tvorbě malého embrya stejně tak u křížení tetraploidní matky s diploidním otcem ($4x \times 2x$). Avšak byl zde pozorován rozdíl v době celularizace, jelikož u $2x \times 4x$ byla pozorována přítomnost centrální vakuoly, která naznačuje, že zde dochází k opožděné celularizaci oproti $4x \times 2x$, kde došlo k precizní celularizaci, jelikož centrální vakuola byla již nahrazena buňkami endospermu. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky dříve získanými z interploidních křížení u *Arabidopsis*, rýže a kukuřice (Scott et al., 1998; Pennington et al., 2008; Sekine et al., 2013).

Endospermobilin (např. rýže, kukuřice, pšenice a ječmene) nejdůležitějším místem pro syntézu zásobního škrobu (Huang et al., 2021). Z tohoto důvodu byly hodnoceny s využitím barvení Lugolovým

roztokem vývojové přechody endospermu po celularizaci, kdy bylo zkoumáno hromadění zásobních látek, konkrétně právě škrobu. U kontrolních křížení ($2x \times 2x$; $4x \times 4x$) a křížení $4x \times 2x$ bylo pozorováno hromadění škrobu v celém endospermu, nejhustější v blízkosti embrya, zatímco u křížení $2x \times 4x$ byl škrob pozorován pouze v osemeni, což bylo v souladu s výsledky získanými u rýže (Sekine et al., 2013).

V této studii jsme poprvé charakterizovali fenotyp endospermu v semenech produkovaných interploidním křížením u ječmene. Semena s přebytkem mateřského genomu ($4n \times 2n$) vykazovala předčasnou celularizaci. Naproti tomu semena s nadbytkem otcovského genomu ($2n \times 4n$) vykazovala opožděnou celularizaci. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky uváděných dříve u jiných druhů (Scott et al., 1998; Pennington et al., 2008; Sekine et al., 2013; Stoute et al., 2012; Lafon-Placette et al., 2018) a ukazují vliv parentálního konfliktu během vývoje interploidních semen.

Data u jiných druhů ukazují, že vzniklé fenotypy interploidních kříženců jsou značně podobné interspecifickým křížením (Lafon-Placette et al., 2017; Lafon-Placette et al., 2018), tato studie nám tak může poskytnout detailnější odpověď týkající se mechanismů ovlivňující hybridizační bariéru u obilnin.

7 Závěr

V teoretické části diplomové práce jsme se zaměřili na zpracování literární rešerše na téma ječmen setý, polyploidizace, parentální konflikt a triploidní blok. V experimentální části jsme se poté věnovali třem základním úkolům. Prvním úkolem bylo vytvořit tetraploidní linie ječmene setého. Druhým úkolem bylo charakterizovat a vybrat ty linie, které jsou stabilní. Třetím úkolem bylo využít tyto stabilní linie pro finální fázi experimentu, kterou bylo interploidní křížení.

Pro vytvoření tetraploidních linií ječmene jsme využili tři genotypy: kultivar Morex, kultivar Compana a divoký ječmen. Tyto genotypy jsme pěstovali jak v půdě, tak v *in vitro* podmínkách. Tetraploidizaci jsme navodili aplikací kolchicinu na rostliny po různě dlouhou dobu (6–24 hod). Cílem bylo zjistit optimální délku působení kolchicinu. Poté jsme hodnotili schopnost těchto rostlin přežít ošetření kolchicinem, ale také úspěšnost tetraploidizace. Ukázalo se, že tetraploidizace byla účinnější pro kultivary Morex, Compana v *in vitro* podmínkách. Zároveň jsme ale pozorovali u těchto kultivarů nižší procento přežití. Naopak u divokého ječmene byla vyšší úspěšnost tetraploidizace i procento přežití u rostlin pěstovaných v půdě.

Poté jsme provedli řadu experimentů, které ověřovaly stabilitu jednotlivých tetraploidních linií všech tří genotypů. Výsledky ukázaly, že pouze tetraploidní linie divokého ječmene měly životaschopný pyl a normálně vyvinutá semena s vysokou klíčivostí.

Tyto linie tak byly použity pro interploidní křížení mezi diploidními a tetraploidními rostlinami za účelem sledování vlivu parentálního konfliktu na vývoj semen. Zjistili jsme, že při křížení tetraploidní matky s diploidním otcem dochází k produkci lehčích a menších semen z důvodu předčasné celularizace. Při interploidním křížení diploidní matky a tetraploidního otce dochází k opožděné celularizaci endospermu, což má za následek vznik semen s nedostatečně vyvinutým endospermem. V obou směrech křížení semena byla neklíčivá.

Výsledky této diplomové práce prokázaly vliv parentálního konfliktu během vývoje interploidních semen.

8 Seznam použité literatury

- Aldoori WH, Giovannucci EL, Rockett HR, Sampson L, Rimm EB, Willett WC (1998): A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *The Journal of Nutrition* 128: 714–719.
- Alexander MP (1980): A Versatile Stain for Pollen Fungi, Yeast and Bacteria. *Stain Technology* 55(1): 13–18.
- Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2011): Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany* 108(1): 37–50.
- Alqudah AM, Schnurbusch T (2017): Heading Date Is Not Flowering Time in Spring Barley. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Bahrami F, Arzani A, Rahimmalek M (2019): Photosynthetic and yield performance of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) under terminal heat stress. *PHOTOSYNTHETICA* 57(1): 9–17.
- Barow M (2006): Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays* 28(3): 271–281.
- Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA (2008): High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4(1): 22.
- Biagioli C, Rios R, Basso AL, Franzone P (2006): In vitro culture response of barley (*Hordeum vulgare*) ethylene synthesis mutant MC 169. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(3).
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E; European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (2003): Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): An observational study. *Lancet* 361: 1496–1501.
- Blattner FR (2018): Taxonomy of the Genus *Hordeum* and Barley (*Hordeum vulgare*). *The Barley Genome*, 11–23.
- Brandvain Y, Haig D (2005): Divergent Mating Systems and Parental Conflict as a Barrier to Hybridization in Flowering Plants. *The American Naturalist* 166(3): 330–338.

- Comai L (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6(11): 836–846.
- Corneillie S, De Storme N, Van Acker R, Fangel JU, De Bruyne M, De Rycke R, Geelen D, Willats WGT, Vanholme B, Boerjan W (2019): Polyploidy Affects Plant Growth and Alters Cell Wall Composition. *Plant Physiology* 179(1): 74–87.
- Danilova TV, Friebe B, Gill BS (2012): Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat. *Chromosoma* 121(6): 597–611.
- Dante RA, Larkins BA, Sabelli PA (2014): Cell cycle control and seed development. *Frontiers in Plant Science* 5: 493.
- Dilkes BP, Comai L (2004): A differential dosage hypothesis for parental effects in seed development. *The Plant Cell* 16: 3174–3180.
- Dolezel J, Bartos J (2005): Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95(1): 99–110.
- Doyle GG (1986): Aneuploidy and inbreeding depression in random mating and self-fertilizing autotetraploid populations. *Theoretical and Applied Genetics* 72(6).
- Doyle JJ, Coate JE (2019): Polyploidy, the Nucleotype, and Novelty: The Impact of Genome Doubling on the Biology of the Cell. *International Journal of Plant Sciences* 180(1): 1–52.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL (2001): Endoreplication Cell Cycles. *Cell* 105(3): 297–306.
- Evans GM, Rahman MM (1990): The basis of low grain yield and infertility in autotetraploid barley (*Hordeum vulgare*). *Heredity* 64(3): 305–313.
- Fatima B, Usman M, Khan MS, Khan IA, Khan MM (2015): Identification of citrus polyploids using chromosome counts, morphological and SSR marker. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 52(1): 107–114.
- Fetch TB, Steffenson BJ, Nevo E (2003): Diversity and sources of multiple disease resistance in *Hordeum spontaneum*. *Plant Disease* 87: 1439–1444.
- Friedman WE, Williams JH (2003): MODULARITY OF THE ANGIOSPERM FEMALE GAMETOPHYTE AND ITS BEARING ON THE EARLY EVOLUTION OF ENDOSPERM IN FLOWERING PLANTS. *Evolution* 57(2): 216–230.

- Friedman WE, Bachelier JB, Hormaza JI (2012): Embryology in *Trithuria submersa* (Hydatellaceae) and relationships between embryo, endosperm, and perisperm in early-diverging flowering plants. *American Journal of Botany* 99(6): 1083–1095.
- Gantait S, Mukherjee E (2021): Induced autopolyploidy-a promising approach for enhanced biosynthesis of plant secondary metabolites: an insight. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19(1): 4.
- Gernand D, Rutten T, Pickering R, Houben A (2006): Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenetic and Genome Research* 114(2): 169–174.
- Ghani A, Neamati SH, Azizi M, Saharkhiz MJ, Farsi M (2014): Artificial Autotetraploidy Induction Possibility of Two Iranian Endemic Mint (*Mentha mozaffarianii*) Ecotypes. *Notulae Scientia Biologicae* 6(2): 185–191.
- Grzybowski CR de S, Ohlson O de C, Silva RC da, Panobianco M (2012): Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Revista Brasileira de Sementes* 34(1): 47–54.
- Haig D (2013): Kin Conflict in Seed Development: An Interdependent but Fractious Collective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29(1): 189–211.
- Haughn G, Chaudhury A (2005): Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 10(10): 472–477.
- Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B (2008): Low-Temperature and Daylength Cues Are Integrated to Regulate FLOWERING LOCUS T in Barley. *PLANT PHYSIOLOGY* 147(1): 355–366.
- Hicks KB, Montanti J, Nghiem NP (2014): Use of Barley Grain and Straw for Biofuels and Other Industrial Uses. *Barley* 269–291.
- Holásková E, Galuszka P, Mičúchová A, Šebela M, Öz MT, Frébort I (2018): Molecular Farming in Barley: Development of a Novel Production Platform to Produce Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biotechnology Journal* 13: e1700628.
- Hosseini HR, Chehrazi M, Nabati D, Mahmoodi M (2018): Colchicine-induced autotetraploidy and altered plant cytogenetic and morphophysiological traits in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Advances in Horticultural Science* 32(2): 229–238.
- Huang L, Tan H, Zhang C, Li Q, Liu Q (2021): Starch biosynthesis in cereal endosperms: An updated review over the last decade. *Plant Communications* 2(5): 100237.

- Chen G, Li C, Shi Y, Nevo E (2008): Wild Barley, *Hordeum spontaneum*, a Genetic Resource for Crop Improvement in Cold and Arid Regions. *Sciences in Cold and Arid Regions*: 0115–0124.
- Chen Y, Xu H, He T, Gao R, Guo G, Lu R, Chen Z, Liu C (2021): Comparative Analysis of Morphology, Photosynthetic Physiology, and Transcriptome Between Diploid and Tetraploid Barley Derived From Microspore Culture. *Frontiers in Plant Science* 12: 626916.
- Ishikawa R, Ohnishi T, Kinoshita Y, Eiguchi M, Kurata N, Kinoshita T (2011): Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *The Plant Journal* 65: 798–806.
- Jacobs DR Jr, Gallaher DD (2004): Whole grain intake and cardiovascular disease: A review. *Current Atherosclerosis Reports* 6: 415–423.
- James MG, Denyer K, Myers AM (2003): Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* 6 :215–22.
- Kapusi E, Ma L, Teo CH, Hensel G, Himmelbach A, Schubert I, Mette MF, Kumlehn J, Houben A (2012): Telomere-mediated truncation of barley chromosomes. *Chromosoma* 121(2): 181–190.
- Kinoshita T (2018): A parental tug-of-war. *Nature Plants* 4(6): 329–330.
- Köhler C, Mittelsten Scheid O, Erilova A (2009): The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics* 26(3): 142–148.
- Komatsuda T, Pourkheirandish M, He C, Azhaguvel P, Kanamori H, Perovic D, Stein N, Graner A, Wicker T, Tagiri A, Lundqvist U, Fujimura T, Matsuoka M, Matsumoto T, Yano M (2007): Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(4): 1424–1429.
- Lafon-Placette C, Hatorangan MR, Steige KA, Cornille A, Lascoux M, Slotte T, Köhler C (2018): Paternally expressed imprinted genes associate with hybridization barriers in *Capsella*. *Nature Plants* 4(6): 352–357.
- Lafon-Placette C, Johannessen IM, Hornslien KS, Ali MF, Bjerkan KN, Bramsiepe J, Glöckle BM, Rebernik CA, Brysting AK, Grini PE, Köhler C (2017): Endosperm-based hybridization barriers explain the pattern of gene flow between *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis arenosa* in Central Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(6): E1027–E1035.
- Langridge P (2018): Economic and academic importance of barley. In: Stein N, Muehlbauer GJ, (eds): *The barley genome*, pp. 1–10, Springer, Cham.
- Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, Guimarães PM, Pereira TD, Galhardo I, Silva JP, Brasileiro ACM, Oliveira RS, Silva PÍT, Vadez V, Araujo ACG (2012): The effect of tetraploidization of wild

- Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany* 84: 17–24.
- Leblanc O, Pointe C, Hernandez M (2002): Cell cycle progression during endosperm development in *Zea mays* depends on parental dosage effects. *The Plant Journal* 32(6): 1057–1066.
- Li N, Dickinson HG (2009): Balance between maternal and paternal alleles sets the timing of resource accumulation in the maize endosperm. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277(1678): 3–10.
- Lin BY (1984): Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107: 103–15.
- Liu S, Willett WC, Manson JE, Hu FB, Rosner B, Colditz G (2003): Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78: 920–927.
- Lopes MA, Larkins BA (1993): Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5: 1383–139.
- Lysák MA, Cíhalíková J, Kubaláková M, Šimková H, Künzel G, Doležel J (1999): *Chromosome Research* 7(6): 431–444.
- Manzoor A, Ahmad T, Bashir MA, Hafiz IA, Silvestri C (2019): Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants* 8(7): 194.
- Mason AS, Pires JC (2015): Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics* 31(1): 5–10.
- Moïse JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA (2005): Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 41(5): 620–644.
- Müntzing A (1930): Über Chromosomenvermehrung in Galeopsis-Kreuzungen und ihre phylogenetische Bedeutung. *Hereditas* 14: 153–172.
- Müntzing A, Tometorp G, Mundt-Petersen K (1937): TETRAPLOID BARLEY PRODUCED BY HEAT TREATMENT. *Hereditas* XXII: 401–406.
- Nowicka A, Ferková Ľ, Said M, Kovacik M, Zwyrtková J, Baroux C, Pecinka A (2023): Non-Rab1 chromosome organization in endoreduplicated nuclei of barley embryo and endosperm tissues. *Journal of Experimental Botany* 74(8): 2527–2541.
- Nowicka A, Kovacik M, Tokarz B, Vrána J, Zhang Y, Weigt D, Doležel J, Pecinka A (2021): Dynamics of endoreduplication in developing barley seeds. *Journal of Experimental Botany* 72: 268–282.

- Olsen O (2001): Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52: 233–67.
- Olsen O (2004): Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 214–227.
- Pennington PD, Costa LM, Gutierrez-Marcos JF, Greenland AJ, Dickinson HG (2008): When Genomes Collide: Aberrant Seed Development Following Maize Interploidy Crosses. *Annals of Botany* 101(6): 833–843.
- Pires ND (2014): Seed evolution: parental conflicts in a multi-generational household. *BioMolecular Concepts*: 5(1).
- Robinson DO, Coate JE, Singh A, Hong L, Bush M, Doyle JJ, Roeder AHK (2018): Ploidy and Size at Multiple Scales in the *Arabidopsis* Sepal. *The Plant Cell* 30(10): 2308–2329.
- Rodríguez MV, Barrero JM, Corbineau F, Gubler F, Benech-Arnold RL (2015): Dormancy in cereals (not too much, not so little): about the mechanisms behind this trait. *Seed Science Research* 25(02): 99–119.
- Sabelli P, Larkins B (2009): The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology* 149: 14–26.
- Sabelli PA (2012): Seed Development: A Comparative Overview on Biology of Morphology, Physiology, and Biochemistry Between Monocot and Dicot Plants. *Seed Development: OMICS Technologies Toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield*: 3–25.
- Sajjad Y, Jaskani MJ, Mehmood A, Ahmad I, Abbas H (2013): Effect of colchicine on in vitro polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). *Pakistan Journal of botany* 45(3): 1255–1258.
- Sarkar KR, Coe EH (1971): Anomalous Fertilization in Diploid-Tetraploid Crosses in Maize 1. *Crop Science* 11(4): 539–542.
- Sarwar H (2013): The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *Journal of Cereals and Oilseeds* 4(3): 32–35.
- Satpathy P, de la Fuente SA, Ott V, Müller A, Büchner H, Daghma DES, Kumlehn J (2021): Generation of Doubled Haploid Barley by Interspecific Pollination with *Hordeum bulbosum*. In: Seguí-Simarro JM (ed.): *Doubled Haploid Technology: Volume 1: General Topics, Alliaceae, Cereals*, pp. 215–226, *Methods in Molecular Biology*.
- Sekine D, Ohnishi T, Furuumi H, Ono A, Yamada T, Kurata N, Kinoshita T (2013): Dissection of two major components of the post-zygotic hybridization barrier in rice endosperm. *The Plant Journal* 76(5): 792–799.

- Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG (1998): Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 3329–41.
- Song Q, Chen ZJ (2015): Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current Opinion in Plant Biology* 24: 101–109.
- Sourour Ayed (2014): Efficient Production of Tetraploid Barley (*Hordeum vulgare* L.) by Colchicine Treatment of Diploid Barley. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2.
- Stoute AI, Varenko V, King GJ, Scott RJ, Kurup S (2012): Parental genome imbalance in *Brassica oleracea* causes asymmetric triploid block. *The Plant Journal* 71: 503–16.
- Sun FY, Liu L, Yu Y, Ruan XM, Wang CY, Hu QW, Wu DX, Sun G (2020): MicroRNA-mediated responses to colchicine treatment in barley. *Planta* 251(2): 44.
- The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716.
- Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES (2006): HvVRN2 Responds to Daylength, whereas HvVRN1 Is Regulated by Vernalization and Developmental Status. *PLANT PHYSIOLOGY* 140(4): 1397–1405.
- Tsukaya H (2008): Controlling Size in Multicellular Organs: Focus on the Leaf. *PLoS Biology* 6(7): e174.
- Valentine DH (1954): Seed incompatibility. p. 170. *Proceedings of the 8th International Botany Congress, Paris* 9: 170.
- Wang X, Chen ZH, Yang C, Zhang X, Jin G, Chen G, Wang Y, Holford P, Nevo E, Zhang G, Dai F (2018): Genomic adaptation to drought in wild barley is driven by edaphic natural selection at the Tabigha Evolution Slope. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(20): 5223–5228.
- Wangenheim KHV (1957): Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Chromosomenzahl und Kreuzbarkeit bei *Solanum*-Arten. *Z. Indukt. Abstammungs. Vererbungslehre* 88: 2 1–37.
- Watkin AE (1932): Hybrid sterility and incompatibility. *Journal of Genetics* 25: 125–162.
- Yan J, Chen G, Cheng J, Nevo E, Gutterman Y (2008): Phenotypic variation in caryopsis dormancy and seedling salt tolerance in wild barley, *Hordeum spontaneum*, from different habitats in Israel. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55(7): 995–1005.

- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J (2006): The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(51).
- Yang F, Fernández Jiménez N, Majka J, Pradillo M, Pecinka A (2021): Structural Maintenance of Chromosomes 5/6 Complex Is Necessary for Tetraploid Genome Stability in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 12: 748252.
- Yildiz M (2011): Evaluation of the effect of in vitro stress and competition on tissue culture response of flax. *Biologia Plantarum* 55(3): 541–544.
- Young TE, Gallie DR (1999): Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology* 39: 915–926.
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974): A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14(6): 415–421.
- Zhang C, Cao D, Kang L, Duan J, Ma X, Yan G, Wang Y (2014): Ploidy variation and karyotype analysis in *Hemerocallis* spp. (Xanthorrhoeaceae) and implications on daylily breeding. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 42: 183–193.
- Zhang X, Gao J (2020): Colchicine-induced tetraploidy in *Dendrobium cariniferum* and its effect on plantlet morphology, anatomy and genome size. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.

8.1 Internetové zdroje

- Australian Government Office of the Gene Technology Regulator, 2021. The Biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). [online] [18.1.2023] Dostupné z <http://www.ogtr.gov.au>